
Aus der Klinik für Strahlentherapie
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Vergleich numerischer und struktureller Aberrationen in HPV-positiven
und HPV-negativen Kopf-Hals-Tumorzelllinien**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Johannes Patze

aus Würzburg
Marburg 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
27.04.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Frau Prof. Dr. Andrea Wittig

1. Korreferent Frau Prof. Dr. Andrea Maisner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung	8
1.1 Einführung Kopf-Hals Tumore	8
1.1.1 Epidemiologie & Ätiologie.....	8
1.2 Therapie & Prognose von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region	9
1.3 Molekulare Unterschiede in der Entstehung HPV-positiver und -negativer Kopf-Hals-Tumoren	11
1.4 Präklinische HPV-positive und HPV-negative HNSCC Modelle	13
1.5 Fragestellung	15
2 Material & Methoden.....	16
2.1 Zellkultur	16
2.2 Metaphase Technik	16
2.2.1 Arretieren und Fixieren der Zellen	16
2.2.2 Herstellen der Chromosomenpräparate.....	18
2.3 G-Banden Färbung	18
2.4 Multicolor-Fluoreszenz in situ Hybridisierung (m-FISH).....	18
2.5 Aufnahme und Auswertung der Präparate.....	19
2.5.1 Numerische Auswertung.....	19
2.5.2 Strukturelle Auswertung.....	20
2.6 Durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehalts	23
2.6.1 Vorbereitung & Durchführung	23
2.6.2 Auswertung	25
3 Ergebnisse	27
3.1 Übersicht	27
3.2 Numerische Analyse	27
3.3 Durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehalts	29
3.4 Multicolor-Fluoreszenz in situ Hybridisierung (m-FISH).....	31
3.4.1 Numerische Aberrationen in der m-FISH Analyse.....	31
3.4.2 Strukturelle Aberrationen in der m-FISH-Analyse	35
4 Diskussion	40
4.1 Zelllinien als Modell in der Tumorforschung	40

4.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Untersuchung chromosomaler Instabilität: Möglichkeiten und Grenzen	41
4.3 Analyse zytogenetischer und DNA-zytometrischer Ploidie	42
4.4 Analyse numerischer chromosomaler Aneuploidie	43
4.5 Analyse struktureller Aneuploidie	45
4.6 Genomische Instabilität in Kopf-Hals-Tumorzelllinien	47
4.7 Schlussfolgerung und Ausblick.....	49
5 Literaturverzeichnis.....	50
6 Zusammenfassung	62
7 Summary	63
8 Anhang	64
8.1 Chemikalien, Materialien und Geräte	64
8.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	64
8.1.2 Materialien	66
8.1.3 Geräte	67
8.1.4 Software	68
8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer	69
8.3 Danksagung.....	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	G-Banden Färbung der Zelllinie UT-SCC-33.....	20
Abbildung 2:	m-FISH Karyogramm der Zelllinie UM-SCC-6.....	21
Abbildung 3:	Falschfarbendarstellung eines m-FISH Karyogramms.....	22
Abbildung 4:	Einzelauswertung eines Chromosoms.....	22
Abbildung 5:	Histogramm der Zelllinie UPCI:SCC152 und gesunder Zellen.....	26
Abbildung 6:	Verteilung der Chromosomenzahlen und Mittelwerte	27
Abbildung 7:	Verteilung der DNA-Indices je Zelllinie.....	29
Abbildung 8:	Korrelation zwischen Anzahl Chromosomen und DNA-Gehalt.....	30
Abbildung 9:	m-FISH Karyogramme HPV-negativer und HPV-positiver Zelllinien.....	32
Abbildung 10:	Ploidie je Chromosom.....	33
Abbildung 11:	Korrelation der Ploidie nach HPV Status.....	34
Abbildung 12:	Anzahl Chromosomen je Methode.....	34
Abbildung 13:	Anzahl Translokationen je Chromosom.....	35
Abbildung 14:	Circos Plot der Translokationen	36
Abbildung 15:	Mittlere Anzahl einfacher und komplexer Translokationen...	37
Abbildung 16:	Mittlere Anzahl klonaler und nicht-klonaler Translokationen.....	38
Abbildung 17:	Beteiligung an Translokationen pro Chromosom.....	39
Abbildung 18:	Aneuploidie pro Chromosom bei HNSCC Zelllinien in verschiedenen Publikationen.....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Merkmale der verwendeten Zelllinien.....	17
Tabelle 2:	Ploidie pro Zelllinie nach Chromosomenzahlbestimmung.....	28
Tabelle 3:	DNA-Indices nach Durchflusszytometrie.....	30
Tabelle 4:	Alphabetische Auflistung der Chemikalien und Reagenzien.....	64
Tabelle 5:	Alphabetische Auflistung der Materialien.....	66
Tabelle 6:	Alphabetische Auflistung der Geräte.....	67
Tabelle 7:	Alphabetische Auflistung der Software.....	68

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
BARD1	BRCA1-associated ring domain 1
bp	Basenpaare
BRCA1	Breast Cancer 1
CNA	Kopienzahlveränderung
DAPI	Diaminophenylindolhydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	und andere
ERCC3	Excision repair cross-complementation group 3
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FANCD2	Fanconi anemia group D2
FBS	Fetales Kälber Serum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	humanes Papillomavirus
KCl	Kaliumchlorid
m-FISH	Multicolor-Fluoreszenz in situ Hybridisierung
MSH 2	Muts protein homolog 2
MSH 6	Muts protein homolog 6
NaOH	Natronlauge
NHEJ1	Non-homologous end-joining factor 1
NOX	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PerCP	Peridinin-chlorophyll-Protein Komplex
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute
vs.	versus
XLF	XRCC4-like factor
XRCC5	X-ray repair cross-complementing 5

1 Einleitung

1.1 Einführung Kopf-Hals Tumore

Die meisten Tumore des Kopf-Hals-Bereichs entstehen aus dem Epithel des oberen Aerodigestivtrakts, histologisch mit ~90% vornehmlich als Plattenepithelkarzinom klassifiziert (*Head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) (Kreimer et al., 2005). Dazu gehören Karzinome des Naso-, Oro-, und Hypopharynx sowie des Larynx. Betroffene Patienten präsentieren sich meist mit einer schwachen oder eher unspezifischen Beschwerdesymptomatik, wodurch viele Tumoren erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden. Neben Leitsymptomen wie Epistaxis, beeinträchtigter Nasenatmung, Dysphagie, Heiserkeit, Mundgeruch, vermehrtem Speichelfluss, Globusgefühl und Rausperzwang können Hämoptysen und Dyspnoe, Paukenerguss, Hörminderung, indolente Schwellungen am Hals, sowie Paresen der Hirnnerven auftreten (Lenarz and Boenninghaus, 2012).

1.1.1 Epidemiologie & Ätiologie

Kopf-Hals-Tumore sind weltweit die sechsthäufigste Malignomerkrankung (Ferlay et al., 2010). Nach einem Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 (Zentrum für Krebsregisterdaten beim Robert-Koch-Institut) erkrankten im Jahr 2013 etwa 13.000 Männer und 4.500 Frauen an einem bösartigen Tumor im Kopf-Hals-Bereich. 5.500 Männer und 1.700 Frauen verstarben an den Folgen dieser Erkrankung. Während sowohl Inzidenz als auch Mortalität bei Männern auf deutlich höherem Niveau stabil bzw. rückläufig sind, steigen insbesondere die Erkrankungen von bösartigen Tumoren der Mundhöhle und des Rachenraums bei Frauen in Deutschland deutlich an.

Im Wesentlichen lassen sich HNSCC auf zwei Gruppen von Risikofaktoren zurückführen. Die Mehrheit der Tumore, insbesondere Neoplasien der Mundhöhle, des Hypopharynx und des Larynx, sind in der Regel mit langjährigem Tabak- und Alkoholkonsum assoziiert, während eine zweite Gruppe von HNSCC als virus-induzierte Tumoren in Verbindung mit einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) auftreten (Agaimy and Weichert, 2016).

Während die Neuerkrankungsraten der Mundhöhlen-, Larynx- und Hypopharynxkarzinome als klassische nikotin- und alkoholassoziierte Karzinome in den meisten Ländern rückgängig sind, wird weltweit ein Anstieg der Inzidenz von HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen beobachtet (Simard et al., 2014). Die Epidemiologie des HPV-

assoziierten Kopf-Hals-Tumors ist variabel und hängt stark von der Tumorsubpopulation und -region ab. HPV-induzierte Plattenepithelkarzinome sind neben dem Zungengrund und den Tonsillen überwiegend im Oropharynx lokalisiert (Tinhofer et al., 2015), sprechen besser auf eine Radiochemotherapie an und weisen einen prognostisch günstigeren klinischen Verlauf auf (Thibaudeau et al., 2013; Das et al., 2015).

Bezogen auf die Gesamtheit aller Plattenepithelkarzinome des Oropharynx beläuft sich der Anteil HPV-assoziiierter Tumore im Oropharynx in Deutschland auf etwa 30–50 % (Reuschenbach et al., 2016; Tinhofer et al., 2015). In den letzten Jahren haben sich Hinweise auf einen globalen Trend zur Steigerung der Inzidenz für Oropharynx-Karzinome gehäuft, der am auffälligsten in Nordamerika und Nordeuropa ist (Gillison et al., 2015). Insbesondere Tonsillenkarzinome zeigen hohe Zuwachsraten (Näsman et al., 2009).

Bezüglich der Tumorentstehung unterscheiden sich Noxen- und Virus-assoziierte Tumore deutlich. Die durch Tabak und Alkohol verursachte Karzinogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der durch eine kontinuierliche Induktion von DNA-Schäden initiiert wird und über einen langen Zeitraum zu einer Akkumulation genetischer Veränderungen in mehreren Proto-Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen führt (Jou and Hess, 2017). Bei der HPV-induzierten Karzinogenese ist pathogenetisch die Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7 entscheidend, die die zellulären Tumorsuppressorproteine p53 und Rb inaktivieren (Wittekindt et al., 2012).

1.2 Therapie & Prognose von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region

Der Unterschied in der Tumorentstehung HPV- und Noxen-induzierter Tumore zeigt sich klinisch in einem unterschiedlichen Ansprechen auf die Therapie mit einer besseren Prognose für HPV-assoziierte Tumore (Nygård et al., 2012), insbesondere nach Radiochemotherapie (Lohaus et al., 2014; Ang et al., 2010; Lassen et al., 2009; Sethi et al., 2012).

Obwohl HPV-positive Tumore früher lymphogen metastasieren als Noxen-induzierte Tumore, zeigt sich in verschiedenen Studien ein signifikant besseres Gesamtüberleben für die im Durchschnitt jüngeren Patienten im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativen Tumoren (Ang et al., 2010; Sethi et al., 2012; Tinhofer et al., 2015).

Die Prognose ist maßgeblich vom initialen Tumorstadium abhängig, das durch die

Tumorgröße und -invasivität (T), dem Befall von regionalen Lymphknoten (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) bestimmt wird. Während die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei lokalisierten Tumoren und einem günstigen Risikoprofil bei über 80% liegt, sinkt sie auf unter 50% bei Vorhandensein von regionalen Metastasen und auf unter 30 % bei Patienten mit Fernmetastasen (Jemal et al., 2011).

Das bessere Überleben und Ansprechen auf die Therapie von HPV-positiven Tumoren hat bisher keinen Einfluss auf das therapeutische Regime, wenn auch eine Deeskalation in der Therapie diskutiert wird (Dietz et al., 2017). Zur Risikostratifizierung von Patienten mit Oropharynxkarzinomen haben Ang et al. einen Algorithmus beschrieben, der die Faktoren Rauchen, Tumorstadium und HPV-Status berücksichtigt (Ang et al., 2010).

Die derzeitige Therapie der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region erfolgt für beide Entitäten multimodal und beinhaltet stadienadaptiert eine Tumorresektion und eine simultane Radiochemotherapie mit Cisplatin. Einer initialen Resektion des Primärtumors schließt sich ggf. eine „*Neck Dissection*“ an, bei der die cervicalen Lymphknoten entfernt werden. Diese wird aufgrund der verbesserten Prognose auch ohne Nachweis von lymphatischer Metastasierung empfohlen (Wolff et al., 2012).

Bei kleineren, lokal begrenzten Läsionen kann eine alleinige Operation ausreichend sein. Da aufgrund der anatomischen Lage jedoch über 50 % der Kopf-Hals-Tumore in fortgeschrittenem Stadium entdeckt werden, ist meist eine multimodale Behandlung notwendig (Jemal et al., 2008). Zum jetzigen Zeitpunkt gilt bei resektablen Tumoren die Operation gefolgt von einer adjuvanten Radio- oder Radiochemotherapie als beste Therapieoption für lokal fortgeschrittene Tumore (Urban et al., 2014). Ist der Tumor nicht vollständig resektabel, ist die primäre simultane Radiochemotherapie indiziert (Knecht et al., 2016).

Die Radiatio kann somit adjuvant oder definitiv erfolgen und wird in der Regel normofraktioniert (1,8 – 2 Gy/Tag) (Glenny et al., 2010) mit Gesamtdosen von 54 – 70 Gy appliziert (Wolff et al., 2012). Zur bestmöglichen Schonung von Risikoorganen und Reduktion von Nebenwirkungen wird in der Regel eine intensitätsmodulierte, bildgeführte Radiotherapie (IMRT) eingesetzt, die den Hochdosisbereich auf das Zielgebiet beschränkt (Chao et al., 2001).

Besonders bei fortgeschrittenen Tumoren kann eine neoadjuvante Chemotherapie mit Docetaxel, Cisplatin und 5-Fluorouracil, gefolgt von einer alleinigen Bestrahlung oder

einer simultanen Radiochemotherapie induziert werden, die jedoch nicht als allgemeiner Standard betrachtet werden kann, da sie insbesondere im Oropharynx nicht mit einem Überlebensvorteil assoziiert ist (Albers et al., 2017; Kim et al., 2017; Budach et al., 2016; Quon et al., 2017; Sher et al., 2017). Neben klassischen zytostatischen Chemotherapeutika können im Rahmen einer *Targeted Therapy* neuere Ansätze zum Einsatz kommen, wie die gezielte Inhibition des epidermalen Wachstumsfaktors EGFR. Für fortgeschrittene HNSCC konnte in einer ersten Studie in der Kombinationsbehandlung eine bessere Heilungsrate erreicht werden (Bonner et al., 2006), die allerdings in nachfolgenden Studien nicht bestätigt werden konnte (Martins et al., 2013).

1.3 Molekulare Unterschiede in der Entstehung HPV-positiver und -negativer Kopf-Hals-Tumoren

Das signifikant bessere Ansprechen HPV-assoziiierter Tumore auf die Therapie wird auf die unterschiedliche Karzinogenese und die daraus resultierenden Unterschiede in der Tumorbilogie HPV-positiver und HPV-negativer Karzinome zurückgeführt. Nach einem Modell von Hanahan und Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011) erfolgt die Tumorentstehung Noxen-induzierter Neoplasien über die Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen über einen längeren Zeitraum, bei der Tumorsuppressoren inaktiviert bzw. Protoonkogene aktiviert werden. Durch Selektionsprozesse entstehen Zellklone, die weitere tumorogene Veränderungen ansammeln können. Im Rahmen dieses Mehrstufenprozesses werden Zellzyklus und Zellproliferation gesteigert und der Zelltod inhibiert.

Forschungsergebnisse im Rahmen des TCGA-Projekts (*The Cancer Genome Atlas Network*) weisen in HNSCC am häufigsten inaktivierende Mutationen in den Tumorsuppressorgen TP53 und CDKN2A auf, während die Onkogene CCND1 und MYC oft amplifiziert oder aktivierend mutiert vorliegen (Lawrence et al., The Cancer Genome Atlas, 2015). Der so von den zelleigenen Kontrollmechanismen entkoppelte Zellzyklus führt schließlich zu chromosomaler Instabilität und geht in eine maligne Transformation über.

Für Papillomavirus-assoziierte Tumore spielen neben zufälligen Mutationen die Virusonkogene E6 und E7 eine entscheidende Rolle. In Hinblick auf den normalen Lebenszyklus humaner Papillomaviren, die die epitheliale Basalzellschicht infizieren,

wird die HPV-assoziierte Karzinogenese eher als ein „biologischer Unfall“ verstanden (Wagner et al., 2015). Infizierte Basalzellen werden normalerweise bei immunkompetenten Individuen entweder über das Immunsystem ausgeschaltet oder mit dem Nachwachsen der kutanen Hautschicht eliminiert. Voraussetzung für die Entstehung eines Karzinoms ist eine persistierende HPV-Infektion, die mit Integration oder episomal vorliegender Virus-DNA im Wirtsgenom entsteht. Dabei ist die Expression viraler Genprodukte in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der infizierten Basalzellen streng reguliert (Doorbar et al., 2012).

Früh im viralen Lebenszyklus werden die viralen Onkoproteine E6 und E7 (E = *early*) exprimiert, die die Tumorsuppressorgene p53 und pRb inaktivieren und darüber den Zellzyklus deregulieren sowie intrazelluläre Kontrollmechanismen außer Kraft setzen. Beide haben selbst keine katalytische Funktion oder DNA-Bindungsdomäne, können aber andere Proteine aktivieren, inaktivieren oder für den proteasomalen Abbau markieren (Rautava and Syrjänen, 2012).

Das virale Onkoprotein E6 ist 16-18 kDa groß und sorgt u.a. für eine vermehrte Degradierung des Tumorsuppressorproteins p53. Im physiologischen Zustand steigt durch Zellstress oder DNA-Schäden der p53 Spiegel in der Zelle und initiiert so den Zellzyklusarrest oder die Apoptose. Durch die Degradierung von p53 sorgt das Virus so für eine vermehrte wachstumsfaktorunabhängige Zellproliferation und eine verminderte Apoptose-Induktion. Weiterhin scheint es die Funktion von DNA-Reparaturproteinen zu inhibieren und über eine Aktivierung der humanen *Telomerase Reverse Transkriptase* (hTERT) die Verkürzung der Telomere zu verhindern (Zhang et al., 2014). Dadurch trägt es zur Akkumulation von DNA-Schäden und zur Immortalisierung der Zelle bei.

Das 11 kDa große Onkoprotein E7 interagiert u.a. mit dem Retinoblastom-Protein (pRB). In gesunden Zellen fungiert pRb im nicht-phosphorylierten und damit aktiven Zustand als transkriptioneller Repressor. Es liegt im Komplex mit Mitgliedern der E2 Faktor Transkriptionsfaktor Familie (E2F1-8) vor und blockiert so die Expression E2F-abhängiger Zellzyklusgene. In seiner Funktion als Wachstumssuppressor wird das pRB-Protein gegen Ende der G1-Phase durch Hyperphosphorylierung inaktiviert, was einen Übertritt in die S-Phase ermöglicht. Das virale Onkoprotein E7 sorgt für einen proteasomalen Abbau von pRB, was zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F führt und den Verlust der Zellzykluskontrolle fördert (Moody and Laimins, 2010). Weiterhin induziert es über eine fehlerhafte Zentrosomen-Duplikation mitotische Defekte und trägt so zur chromosomalen Instabilität bei (Duensing and Münger, 2002).

Infolge der vielen virusinduzierten Veränderungen in der Zelle geht man derzeit davon aus, dass der größte, wenn nicht der ganze Teil der Mutationslast der HPV-assoziierten Tumore dem Virus zuzuschreiben ist. Dies wird auch dadurch unterstützt, dass bei HPV-positiven Tumoren fast keine Tumorstadien zu beobachten sind (Klussmann et al., 2009).

Für die Entwicklung von neuen, effektiveren Therapien ist das grundlegende Verständnis der der Tumorentstehung zugrunde liegenden Mechanismen notwendig und wird auf genetischer und molekularer Ebene derzeit intensiv erforscht. Während in früheren Untersuchungen in HPV-positiven Tumoren weniger Kopienzahl-Veränderungen (CNAs, *Copy number alterations*), Amplifikationen und Mutationen als in HPV-negativen Tumoren gefunden wurden (Dahlgren et al., 2003; Braakhuis et al., 2004; Smeets et al., 2006; Klussmann et al., 2009; Conway et al., 2012), zeigen Studien der letzten Jahre, dass sich Mutationslast und Kopienzahl-Veränderung nicht durch den HPV-Status unterscheiden (van Kempen et al., 2015; Seiwert et al., 2015; Lawrence et al., The Cancer Genome Atlas, 2015; Rhie et al., 2015; Hayes et al., 2015). Hayes und Kollegen (Hayes et al., 2015) fassten aktuelle Ergebnisse und vor allem Daten aus dem in 2006 gestarteten Projekt *The Cancer Genome Atlas* zusammen und konnte so eine hohe Übereinstimmung in der genetischen Signatur der Kopf-Hals-Tumore unabhängig vom HPV-Status belegen. Die Daten zeigen für den überwiegenden Teil des Genoms eine hohe Kongruenz zwischen den CNAs HPV-positiver und HPV-negativer Tumore. HPV-positive und HPV-negative Tumore weisen jeweils eine Akkumulation von Zugewinnen bei den Chromosomen 1q, 3q, 5p und 8q auf und zeigen eine hohe Übereinstimmung bei Verlusten auf den Chromosomen 3p, 5q und 11q (Hayes et al., 2015).

1.4 Präklinische HPV-positive und HPV-negative HNSCC Modelle

In präklinischen Studien sollen Unterschiede in den molekularen Charakteristika HPV-positiver und HPV-negativer Tumore aufgedeckt werden, um sie therapeutisch auszunutzen. Dazu werden verschiedene Tumormodelle genutzt, die darauf abzielen, die Erkrankung des menschlichen Körpers in einen Versuchsaufbau im Labor zu übertragen. Die Basis aller *in vitro* Untersuchungen stellen die aus menschlichen Tumoren entwickelten Zelllinien dar. Bisher wurden über 100 Linien aus Kopf-Hals-Tumoren etabliert, die nicht mit dem Virus assoziiert sind (Hay et al., 1994). Durch ihre relativ einfache Handhabbarkeit wird der größte Teil der Grundlagenforschung an diesen

Zelllinien durchgeführt.

Durch das Fehlen eines Wirtsorganismus, dessen Immunsystems und die teilweise lange Kulturzeit können diese die realen Verhältnisse im Körper und dessen Antwort auf Therapien jedoch nur eingeschränkt widerspiegeln (Voskoglou-Nomikos et al., 2003). Dreidimensionale Zellkulturmodelle sind in der Lage, ein physiologisches Zellwachstum bezüglich Sauerstoff- und Nährstoffverteilung realitätsnäher zu simulieren als zweidimensionale Kulturen (Sutherland et al., 1988). Die Etablierung solcher Kulturen ist jedoch deutlich schwieriger und bisher zeigten nur elf HPV-negative HNSCC Linien dreidimensional ein erfolgreiches Wachstum (Mery et al., 2017).

Athymische Nacktmäuse werden seit 1984 erfolgreich zur Erforschung von Kopf-Hals-Tumoren genutzt (Braakhuis et al., 1984). Durch die Immuninsuffizienz der Tiere können HNSCC Zelllinien subkutan (ektop) oder in anatomisch korrekter Lage im Kopf-Hals-Bereich (orthotop) ohne Abstoßungsreaktion implantiert und so das Wachstumsverhalten *in vivo* untersucht werden. Zudem stehen einige Mausmodelle zur Verfügung, in denen Mäuse mit syngen Tumoren einen immunkompetenten Wirt darstellen. Die Zelllinie SCC VII/SF₁ transplantiert in C3H/HeJ Mäuse, stellt hier für HNSCC das am häufigsten genutzte Modell dar (Smith et al., 2006). Zudem kann eine Tumorentstehung durch chemische Reagenzien künstlich im Kopf-Hals-Bereich von Mäusen induziert oder durch Genmanipulation ausgelöst werden und so die Karzinogenese beobachtet werden (Smith et al., 2006).

Modelle zur Untersuchung von HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumoren sind allerdings rar, da weltweit bisher nur sieben HPV-positive HNSCC Zelllinien erfolgreich etabliert werden konnten. An diesen Zelllinien wird ein Großteil der Forschung durchgeführt und somit stellen sie einen grundlegenden Bestandteil der präklinischen Wissenschaft dar. Zellkulturstudien mit diesen Linien konnten in exzellenter Übereinstimmung mit den klinischen Erfahrungen dokumentieren, dass HPV-positive Zellen sensibler gegenüber Strahlung (Arenz et al., 2014; Rieckmann et al., 2013; Kimple et al., 2013) und Cisplatin (Ziemann et al., 2015) sind. Die Ursache für die höhere Empfindlichkeit wird in einer eingeschränkten Reparaturkapazität und Defekten in der Zellzyklusregulation vermutet. Ob die genomische Instabilität zum besseren Therapieansprechen HPV-positiver Tumore beiträgt, wurde bisher noch nicht untersucht und ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.5 Fragestellung

HPV- und Noxen-induzierte Kopf-Hals-Tumore unterscheiden sich klinisch in einem unterschiedlichen Ansprechen auf die Therapie und in einer besseren Prognose für HPV-assoziierte Tumore. Es wird vermutet, dass der Unterschied in der Karzinogenese beider Entitäten sich auch in der genomischen Instabilität widerspiegelt. Studien der letzten Jahre haben bislang gezeigt, dass sich die Genexpressions-Signaturen von HPV-positiven und HPV-negativen Kopf-Hals-Tumoren signifikant unterscheiden, während Kopienzahl-Veränderungen und Mutationshäufigkeit hinsichtlich des HPV-Status wenig Unterschied zeigen. Zur Entwicklung verbesserter Therapiekonzepte werden präklinische Studien an Modellzelllinien durchgeführt, in denen die klinisch beobachtete höhere Empfindlichkeit gegenüber Strahlung und Chemotherapeutika bereits erfolgreich abbildet werden konnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen als Ausdruck von chromosomaler Instabilität in HPV- und Noxen-assoziierten Modellzelllinien vergleichend zu untersuchen. Dazu wurden fünf der derzeit sieben erhältlichen HPV-positiven Zelllinien (UD-SCC-2, UM-SCC-47, UM-SCC-104, 93-VU-147T, UPCI:SCC152) mit fünf repräsentativen HPV-negativen Zelllinien (UD-SCC-1, UM-SCC-3, UM-SCC-6, UM-SCC-11b, UT-SCC-33) mit zytogenetischen Methoden untersucht und miteinander verglichen.

Für die Analyse numerischer Chromosomenaberrationen werden GTG-gebänderte und m-FISH-gefärbte Metaphase-Chromosomen untersucht. Da chromosomale Aberrationen zu einem von der Diploidie abweichenden DNA-Gehalt führen, wird der DNA-Gehalt über Durchflusszytometrie in HPV-positiven und HPV-negativen Linien vergleichend analysiert.

Strukturelle Aberrationen werden in Form von Translokationen in m-FISH gefärbten Metaphase-Chromosomen quantifiziert. Auf der Suche nach diagnostischen Markern ist hierbei vor allem die Beteiligung einzelner Chromosomen an Translokationen in den beiden Entitäten von Interesse.

2 Material & Methoden

2.1 Zellkultur

Herkunft und Charakteristika der verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die experimentellen Arbeiten wurden im Labor für Strahlenbiologie und Strahlentherapie unter Anleitung von Frau Dr. Andrea Arenz, sowie im Labor für Humangenetik unter Anleitung von Frau Evelyn Kornmann durchgeführt.

Die Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FBS), 1 % L-Glutamin und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA) unter Verwendung von Standard-Zellkulturtechniken im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO₂ Begasung inkubiert. Eine Subkultivierung der als Monolayer wachsenden Linien erfolgte zweimal pro Woche über maximal 20 Passagen.

2.2 Metaphase Technik

2.2.1 Arretieren und Fixieren der Zellen

Zur Anfertigung von Chromosomenpräparaten wurden in der Metaphase arretierte Zellen benötigt. In dieser Phase sind die Chromosomen maximal kondensiert und lichtmikroskopisch beurteilbar. Da für diese Analyse große Mengen an Zellmaterial nötig waren, wurden jeweils drei Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von je 75 cm² angesetzt. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70 - 80 % wurden die Zellen durch Zugabe von Colcemid in einer finalen Konzentration von 0,1 µg/ml in der Metaphase arretiert. Dadurch wird die Ausbildung des Spindelapparats gehemmt und so verhindert, dass die Chromosomen zu den Polen der Kernspindel gezogen werden. Nach Inkubation mit Colcemid wurde der Zellrasen mit dem Verdauungsenzym Trypsin für 5 - 10 min inkubiert, wodurch sich die Zellen vom Boden der Petrischale ablösen und als Suspension vorlagen. Da sich mitotische Zellen abrunden, lösen sich diese auch leichter vom Boden des Kulturgefäßes, weshalb Medium und Waschpuffer vor der Behandlung mit Trypsin gesammelt und zusammen mit der Zellsuspension zentrifugiert wurden. Im nächsten Schritt wurden die pelletierten Zellen mit einer 0,4 % KCl Lösung versetzt und für 20 min bei 37°C zum Anschwellen angeregt. Danach wurden die Zellen in einem -20°C kalten 3:1 Gemisch aus Ethanol und Eisessig fixiert, wodurch die Zellen dehydratisiert und dadurch konserviert wurden. Anschließend wurden sie entweder direkt auf Objektträger aufgetropft oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 1: Merkmale der verwendeten Zelllinien; T = Tumorgroße, N = Lymphknotenstatus, M = Fernmetastasierung, Th = Therapie, kT = keine Therapie, Ub = unbekannt, RT = Radiotherapie, CT = Chemotherapie, RCT = Radiochemotherapie

HPV Status	Zelllinie	Alter/ Geschlecht	TNM-Status / Grading	Lokalisation	Th	Referenz	Erhalten von
HPV-negativ	UD-SCC-1	58 / männlich	T3N2bM0 / G3	Oropharynx	kT	(Ballo et al., 1999); (Lin et al., 2007)	Universität Düsseldorf
	UM-SCC-3	73 / weiblich	T1N3M0 / G3	Nase	kT	(Grenman et al., 1991)	University of Michigan / USA
	UM-SCC-6	37 / männlich	T2N0M0 / G2-G3	Zunge	kT	(Lansford et al., 2002); (Friedman et al., 2014)	University of Michigan / USA
	UM-SCC-11b	65 / männlich	T2N2aM0 / Ub	Larynx	CT	(Grénman et al., 1991); (Lin et al., 2007)	University of Michigan / USA
	UT-SCC-33	86 / weiblich	T2N0M0 / G2-G3	Mundhöhle	kT	(Lansford et al., 2002); (Lin et al., 2007)	University of Turku / Finnland
HPV Status	Zelllinie	Alter/ Geschlecht	TNM-Status / Grading	Lokalisation	Th	Referenz	Erhalten von
HPV-positiv	UD-SCC-2	58 / männlich	T1N3M0 / G3	Hypo-pharynx	Ub	(Ballo H et al., 1999)	Universität Düsseldorf
	UM-SCC-47	53 / männlich	T3N1M0 / G1-G2	Zunge	Ub	(Lin et al., 2007); (Lansford et al., 2002)	University of Michigan / USA
	93-VU-147T	58 / männlich	T4N2M0 / Ub	Mundhöhle	kT	(Steenbergen et al., 1995); (Rieckmann et al., 2013)	University of Amsterdam/ Niederlande
	UM-SCC-104	56 / männlich	T4N2bM0 / G2	Mundhöhle	RCT	(Tang et al., 2012)	University of Michigan / USA
	UPCI:SCC-152	47 / männlich	T2N0M0 / G2	Hypo-pharynx	RCT	(White et al., 2007)	University of Pittsburgh / USA

2.2.2 Herstellen der Chromosomenpräparate

Für die Herstellung der Metaphase-Präparate wurden die Objektträger gereinigt, entfettet und in vollentsalztem Wasser auf Eis bereitgestellt. Die fertige Zellsuspension wurde mit einer Pipette tropfenweise aus einer Fallhöhe von ca. 40 cm auf den Objektträger aufgetropft und danach sofort auf einer Heizplatte für 5 min getrocknet. Durch die mechanische Kraft des Aufpralls platzen die durch die hypotone Lösung stark angeschwollenen Zellen auf und die kondensierten Metaphase-Chromosomen werden auf dem Objektträger gespreitet. Für 24 h wurden die Zellen bei 60°C im Wärmeschrank gealtert, wodurch überschüssiges Wasser verdunstet und die Chromosomen ein besseres Färbeverhalten aufwiesen.

2.3 G-Banden Färbung

Die Trypsin-Vorbehandlung gealterter Chromosomen mit anschließender Giemsa-Färbung erzeugt ein G-Bandenmuster (GTG-Bänderung, *G-bands by Trypsin using Giemsa*), in dem dunkle G-Bänder CG-arme Bereiche, helle hingegen CG-reiche DNA-Banden ausweisen. Die Chromosomen-typische Bänderung erleichtert anhand von Ideogrammen so die Zuordnung der Chromosomen.

Zum Abbau chromosomaler Proteine wurden die Objektträger über 5 - 8 s in einer auf 37° C erwärmten Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde mit einer Behandlung mit 70 %igem Ethanol über 10 - 20 s bei Raumtemperatur gestoppt und die Objektträger in eiskaltem PBS-Puffer über 30 s gewaschen. Anschließend wurden die Präparate für 15 min in einer Küvette mit 8 % Giemsa-Lösung gefärbt, überschüssige Giemsa-Farbstoffe entfernt und die Objektträger bei 60°C an der Luft getrocknet. Aus den so hergestellten Präparaten wurde nun die Chromosomenzahl von mindestens 15 Zellen bestimmt.

2.4 Multicolor-Fluoreszenz in situ Hybridisierung (m-FISH)

Um strukturelle Chromosomenaberrationen zu bestimmen, wurde eine Multicolor-Fluoreszenz in situ Hybridisierung (*m-FISH*) von Frau Kornmann aus dem Institut für Humangenetik an der Universitätsklinik Marburg und nach Einarbeitung durch Herrn Patze durchgeführt. Dafür wurden ungefärbte Metaphase-Präparate mit spezifischen Sonden hybridisiert. Diese Sonden lagern sich komplementär an spezifischen Bereichen

der DNA an und färben so das gesamte Genom ein. Bei dem hier verwendeten 24XCyte m-FISH Kit der Firma MetaSystems wird ein Set aus fünf verschiedenen Fluorochromen mit der DNA hybridisiert. Werden diese mit Licht einer bestimmten Wellenlänge und Energie angeregt, emittieren sie Licht einer höheren Wellenlänge. Über eine spezifische Fluorochromkombination weist jedes Chromosom ein charakteristisches Emissionsspektrum auf, das eine eindeutige Zuordnung und zudem eine Identifikation von strukturellen Chromosomenaberrationen ermöglicht.

Damit eine Hybridisierung stattfinden kann, müssen sowohl die Sonden-DNA als auch die zu untersuchende DNA einzelsträngig vorliegen. Zunächst wurden die Objektträger in einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydriert, zur Verbesserung der Chromosomenstruktur mit einer 0,07 mol Natriumcitrat-Lösung versetzt und anschließend über eine 0,7 mol Natriumhydroxid-Lösung denaturiert. Nach dem Waschen wurden die Objektträger über eine Alkohol-Reihe dehydriert und getrocknet.

Nach Denaturierung der Sonden bei 73°C wurden diese auf die vorbereiteten Objektträger pipettiert. Die Objektträger wurden mit einem Deckglas und einem elastischen Montagekleber (Fixogum®) versiegelt und über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Versiegelung entfernt und zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde mit Natriumcitrat-Lösung bei 72°C stringent gewaschen. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung der DNA mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und nach einem weiteren Waschschrift das Einbetten mit Vectashield®, um die Fluoreszenzfarben der Präparate zu konservieren.

2.5 Aufnahme und Auswertung der Präparate

2.5.1 Numerische Auswertung

Die Giemsa-gefärbten Präparate wurden im Zentrum für Humangenetik, Philipps-Universität Marburg mit Hilfe des Ikaros Karyotypisierung-Systems der Firma MetaSystems ausgewertet. Hierzu wurden die auf dem Objektträger gespreiteten Chromosomen aufgenommen und gezählt. Pro Zelllinie wurde so die Chromosomenzahl von mindestens 15 Zellen ermittelt.



Abbildung 1: G-Banden gefärbte Chromosomen der Zelllinie UT-SCC-33

2.5.2 Strukturelle Auswertung

Mikroskopie

Für die Auswertung der m-FISH Präparate wurde das Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Imaging der Firma Carl Zeiss verwendet. Durch das Licht einer Quecksilberdampflampe angeregt, wird jedem Chromosomenpaar mit seinem charakteristischen Emissionsspektrum eine Farbe zugeordnet, wodurch jedes der 24 menschlichen Chromosomen in einem Hybridisierungsexperiment zugeordnet werden kann. Der Anregungsfilter sorgt dafür, dass nur das Licht mit der passenden Wellenlänge den Objektträger erreicht, um das gewünschte Fluorochrom anzuregen. Durch einen Sperr- bzw. Emissionsfilter wird nur das emittierte und langwelligere Licht des angeregten Fluorochroms zum Okular des Betrachters durchgelassen. Mehrere Sperr- und Anregungsfilter sind im Mikroskop auf einer Drehvorrichtung montiert, wodurch jeweils durch einen Filterwechsel festgestellt werden kann, welches Chromosom oder welcher Abschnitt in welcher Farbe leuchtet. Durch eine computergestützte Auswertung der Farben und ihrer Intensität kann so jedes Chromosom eindeutig zugeordnet bzw. Translokationen oder Insertionen festgestellt werden und photographisch dokumentiert werden.

Software

Mithilfe der ISIS Software der Firma MetaSystems wurden Fluoreszenzbilder aufgenommen und bearbeitet und daraus 15 Karyogramme pro Zelllinie angefertigt. Die Klassifikation der Chromosomen erfolgte anhand der DAPI-Bänderung oder der Farbsignatur. Über ein virtuelles Ausschneiden der willkürlich auf dem Objektträger angeordneten Chromosomen (vergleiche Abb. 2) konnten die klassifizierten Chromosomen im Karyogramm dargestellt werden. Abbildung 3 zeigt exemplarisch das Ergebnis der systematischen Zuordnung in der Zelllinie UM-SCC-6.

Durch die Anwendung von Falschfarben können chromosomale Veränderungen, wie

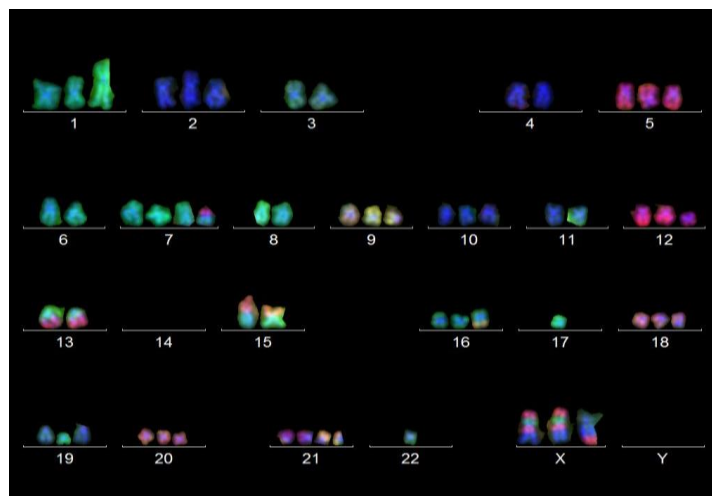


Abbildung 2: m-FISH Karyogramm der Zelllinie UM-SCC-6

Translokationen deutlicher dargestellt und somit leichter zugeordnet werden. Für die Analyse der m-FISH Chromosomen stehen drei unterschiedliche Falschfarben-Ansichtsmodi in der ISIS-Software zur Verfügung: Maximale Farbsättigung (100 % Intensität), DAPI-Bänderungsmuster mit Falschfarben überlagert und Standard-Falschfarben. Die Software stellt dabei die Farbkombination eines Chromosoms oder eines Abschnitts direkt in einer für das jeweilige Chromosom spezifischen Farbe dar, wie beispielsweise hellblau für Chromosom 2 in Abbildung 3.

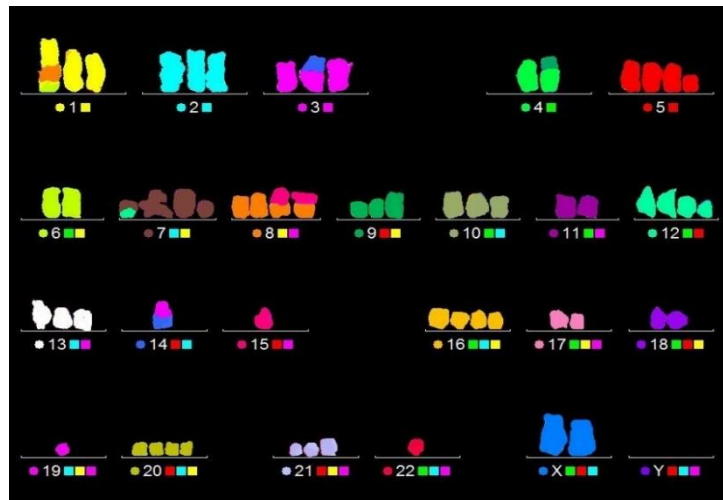


Abbildung 3: Falschfarbendarstellung des obigen Karyogramms der Zelllinie UM-SCC-6

Darüber hinaus können einfache als auch komplexe Aberrationen in einem Chromosom in Bezug auf die Translokationspartner eindeutig zugeordnet werden. Die einzeln aufgenommenen Bilder von allen fünf Farben werden dem Untersucher angezeigt, der aus der Kombination der objektiven Farbintensität (siehe Farbskala in Abb. 4) und dem subjektiven Farbeindruck im Vergleich mit der Intensität der jeweils anderen Farben eine Entscheidung über die Zuordnung des jeweiligen Chromosomenabschnitts fällt. Über dieses Vorgehen können auch komplexe Aberrationen aufgelöst und Bruchpunkte beschrieben werden, wie exemplarisch in Abbildung 4 für eine einfache und eine komplexe Translokation dargestellt.

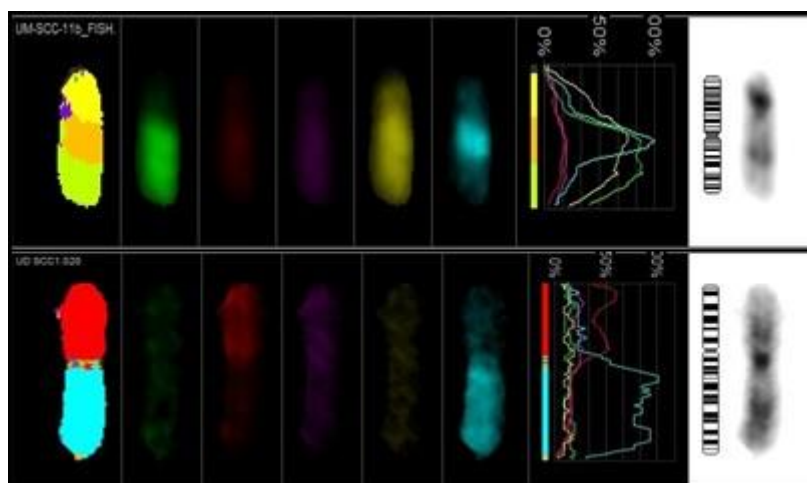


Abbildung 4: Einzelauswertung eines einfachen (unten) Translokationschromosoms bestehend aus Anteilen von Chromosom 5 oben und Chromosom 2 unten und einer komplexen (oben) Translokationschromosoms mit Anteilen von Chromosom 1, 6 und 20. Von links nach rechts: Falschfarbenbild, Einzelfarben, Intensitätsskala, Ideogramm, invertiertes DAPI Bild

Die Aussagekraft der m-FISH ist jedoch beim Nachweis von kleinen Deletionen, Duplikationen und Inversionen eingeschränkt, so dass diese in der Analyse nicht berücksichtigt wurden.

In der Analyse struktureller Aberrationen als Zeichen chromosomaler Instabilität wurden nur Einfach- und Mehrfachtranslokationen berücksichtigt, die sich aufgrund der unterschiedlichen Fluorochrome der Chromosomen eindeutig identifizieren lassen. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass ein Chromosom aus Teilen von zwei oder mehr Chromosomen zusammengesetzt ist. Für jede Zelllinie wurde die Anzahl an Translokationsereignissen gezählt. Bei einfachen Translokationen, bei denen Fragmente zweier Chromosomen beteiligt waren, wurde jeweils ein Translokationsereignis gezählt; bei komplexen Translokationen, bei denen Fragmente von drei Chromosomen beteiligt waren, wurde für das inserierte Fragment hingegen zwei Translokationsereignisse notiert.

Geigl und Koautoren (Geigl et al., 2008) weisen darauf hin, dass es nicht ausreicht, chromosomale Instabilität nur nach Vorliegen von Aneuploidie oder dem Vorhandensein von Aberrationen zu untersuchen, sondern fordern den Einsatz spezialisierter Technologien, um die Variabilität von Zelle zu Zelle zu erfassen. Daher wurde nach klonalen und nicht-klonalen Translokationen unterschieden. Als klonal werden die Chromosomenaberrationen bezeichnet, die eine identische strukturelle Aberration oder den Zugewinn eines Chromosoms in mindestens zwei Metaphasen oder der Verlust des gleichen Chromosoms in mindestens drei Metaphasen zeigen (McGowan-Jordan and Schmid, 2016). Es wird vermutet, dass diese Translokationen während der onkogenen Entwicklung des Tumors entstanden sind, während nicht-klonale, also sporadische Translokationen vor allem auf chromosomale Instabilität während der fortlaufenden Kultivierung der Linie zurückgeführt werden. Daher wurden die Zelllinien zusätzlich auf das Auftreten sowohl von klonalen als auch nicht-klonalen Aberrationen untersucht.

2.6 Durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehalts

2.6.1 Vorbereitung & Durchführung

Eine genomische Instabilität kann sowohl auf chromosomaler Ebene als auch auf Ebene des DNA-Gehalts nachgewiesen werden, da chromosomale Aberrationen zu einem von der Diploidie abweichenden DNA-Gehalt führen. Der nukleäre DNA-Gehalt kann über

die Methode der Durchflusszytometrie bestimmt werden, bei der Zellen einen fokussierten Laserstrahl passieren und Streu- oder Fluoreszenzlicht emittieren. Je nach Größe, Morphologie und/oder Färbung der Zellen werden unterschiedliche Effekte erzeugt, aus denen Eigenschaften der Zellen abgeleitet werden können. Dazu wird eine Suspension von Einzelzellen benötigt, die in einem schnell fließenden Hüllstrom über eine hydrodynamische Fokussierung nacheinander an dem Laserstrahl vorbeigeführt wird. Damit wird sichergestellt, dass die Zellen einzeln den Laserstrahl passieren und eine gleichzeitige Analyse zweier Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt ausgeschlossen werden kann.

Um den DNA-Gehalt zu bestimmen, wurden die hier verwendeten Zelllinien mit dem Nukleinsäure-Interkalator Propidiumiodid behandelt. Diese Substanz lagert sich in die DNA ein und fluoresziert bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm. Die Emissionen des angeregten Propidiumiodids wurden im PerCP-Fluoreszenzkanal (*Peridin-chlorophyll-protein complex*) des Durchflusszytometers gemessen.

Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.1 und 2.2 beschrieben kultiviert, geerntet und eine Einzelzellsuspension abgelöster Zellen hergestellt. Diese wurde in einer finalen Konzentration von 70 % Ethanol fixiert und für mindestens 2 h bei -20°C gelagert. Um den von der Euploidie abweichenden DNA-Gehalt der Tumorzellen zu bestimmen, wurde eine Referenz aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) eines gesunden Spenders mitgeführt. Die Referenzprobe wurde nach Herstellerangaben aus dem heparinisierten Vollblut mittels Ficoll-Paque™ der Firma *GE Healthcare Life Sciences* gewonnen und als fixierte Suspension den Tumorzellproben beigelegt. Nach dem Mischen wurden die beiden Zellpopulationen mit dem aus Propidiumiodid (20 µg/ ml), RNase A (200 µg/ ml), 0,1 % Triton X-100 und PBS bestehenden Färbepuffer lichtgeschützt für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Detergens Triton sorgt zusätzlich zur Ethanolfixierung für eine weitere Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran. Die Behandlung mit RNase bewirkt einen Abbau der vorhandenen RNA, die aufgrund von vorliegenden Sekundärstrukturen das Ergebnis verfälschend mitfärben würde. Aus der so hergestellten Zellsuspension wurden in der FACS Core Facility der Philipps-Universität Marburg mit Hilfe des LSR II (*BD-Biosciences*) 20.000 Zellen pro Messung analysiert.

Die Experimente wurden von Frau Dr. Arenz aus dem Labor für Strahlenbiologie der Universitätsklinik Marburg durchgeführt und die Daten durch Frau Dr. Arenz und Herrn Patze gemeinsam ausgewertet.

2.6.2 Auswertung

Die Daten wurden mit der Software FlowJo Version 7.6 der Firma LCC ausgewertet. Anhand der Streulichtparameter *Forward Scatter* (Vorwärtsstreulicht, Maß für die Zellgröße) und *Side Scatter* (Seitwärtsstreulicht, Maß für die Zellgranularität und -komplexität) wurde die Morphologie der Zellen beurteilt und Zelltrümmer aussortiert. Zelldubletten und Zellaggregate, die bei der Fixierung der Zellproben entstehen, wurden mithilfe der Pulsprozessoren der elektronisch verarbeiteten DNA-Signale in Pulshöhe, -weite und -fläche aus der Analyse ausgeschlossen. Dabei wird ausgenutzt, dass Zelldubletten im Vergleich zu Einzelzellen eine längere Zeit benötigen, um den Laserstrahl zu passieren und daher integriert über die Zeit eine höhere Pulsweite im Fluoreszenz-Signal (PerCP-W) aufweisen.

Aus den so generierten Subpopulationen der Fluoreszenzdaten, die proportional zum DNA-Gehalt sind, wurde nach einem Algorithmus von Watson (Watson et al., 1987) die Zellzyklusverteilung im PerCP-A (PerCP Fläche) Kanal analysiert und mittels Histogramme graphisch dargestellt. Die Histogramme exponentiell wachsender Zellen weisen eine typische DNA-Verteilung auf. Bei Zellen in der G1-Phase liegt ein vollständiger Chromosomensatz mit einfachem DNA-Gehalt vor, der in der S-Phase repliziert wird und an ihrem Ende verdoppelt ist. In der G2-Phase mit zweifachem Chromosomensatz und doppeltem DNA-Gehalt bereitet sich die Zelle auf die mitotische Teilung vor, an deren Ende wieder der einfache Chromosomensatz vorliegt. Zusätzlich lässt sich eine Sub-G1 Population abgrenzen, die fragmentierte, apoptotische Zellen aufweist und durch degradierte DNA charakterisiert ist. Um Veränderungen im Chromosomensatz darzustellen, wurde die Suspension von Tumorzellen mit Zellen eines gesunden Spenders mit normalem diploidem DNA-Gehalt in einem Färbeansatz aufgearbeitet und zeitgleich analysiert.

In der Analyse zeigen Zellen mit einem diploiden Satz von 46 Chromosomen gemäß der Intensität der Färbung im Histogramm einen Peak an typischer Stelle. Wenn die im gleichen Färbeansatz analysierten aneuploiden Tumorzellen mehr DNA aufweisen, also einen Chromosomensatz von $>2n$ haben, liegt der Peak rechts von dem euploiden Zellen (hyperdiploid); haben sie weniger, liegt er hingegen links davon (hypodiploid). Abbildung 5 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Ploidie-Analyse, bei der anhand der Peakpositionen in den durch Durchflusszytometrie gewonnenen Histogrammen der Zelllinie UPCI:SCC152 und PBMC als Referenz auf den relativen DNA-Gehalt zurückgeschlossen werden kann.

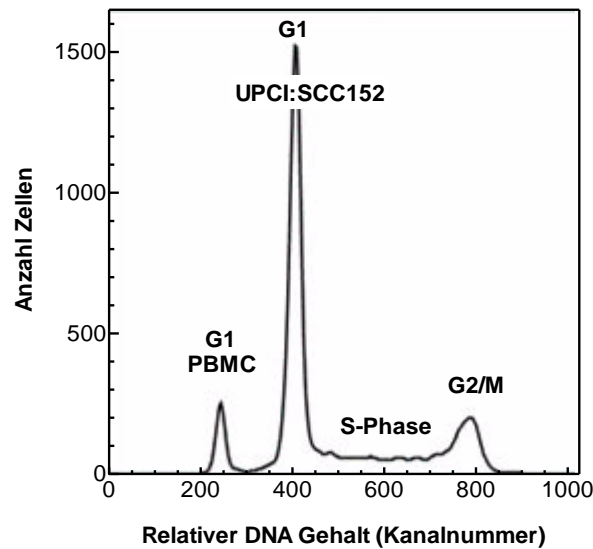


Abbildung 5: Analyse des DNA-Gehalts in der Linie UPCI:SCC152 unter Verwendung von PBMC mit bekanntem DNA-Gehalt als Referenz. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen auf der vertikalen Achse und der Kanalnummer (Fluoreszenz) auf der horizontalen Achse

Aus dem Verhältnis der Intensitäten des Propidiumiodid-Signals der G1-Populationen der gesunden Zellen und den jeweiligen Tumorzellen wurde der DNA-Index berechnet.

$$DNA - Index = \frac{Fluoreszenz - Signal\ Tumorzellen}{Fluoreszenz - Signal\ diploider\ Zellen}$$

Ein DNA-Index von 1 entspricht der Diploidie (2n). Ein Index von >1 stellt dabei einen hyperdiploiden Chromosomensatz dar, ein Index von <1 einen hypodiploiden.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht

Ziel der Arbeit war es, chromosomale Instabilität in Form von numerischen und strukturellen Aberrationen in fünf von sieben der derzeit weltweit erhältlichen HPV-positiven HNSCC Modellzelllinien zu untersuchen und vergleichend HPV-negativen Tumorzelllinien gegenüberzustellen. Die DNA-Ploidie der Linien wurde über die Messung des DNA-Gehalts im Durchflusszytometer ermittelt und chromosomale Ploidie über die Analyse numerischer und struktureller Aberrationen in Metaphase-Präparaten nach Giemsa-Färbung bzw. m-FISH-Technik bestimmt.

3.2 Numerische Analyse

Wie in Kapitel 2.3 und 2.4 beschrieben, wurde die Chromosomenzahl von fünf HPV-positiven und fünf HPV-negativen Zelllinien durch die Auswertung G-Banden-gefärbter Metaphase-Präparate und m-FISH Präparate bestimmt. Für jeden methodischen Ansatz wurde die Anzahl der Chromosomen in mindestens 15 Zellen erfasst, d.h. pro Zelllinie wurden mindestens 30 Metaphasen analysiert.

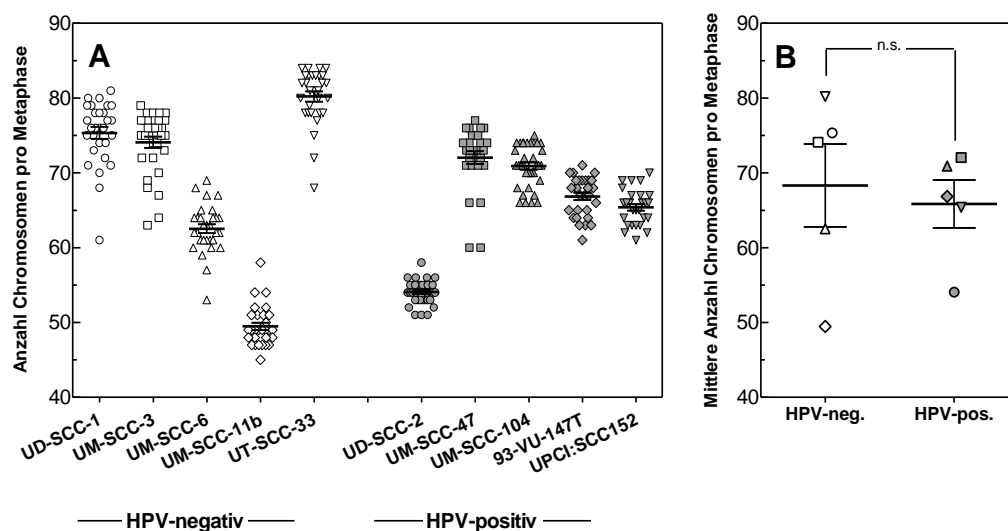


Abbildung 6: Verteilung der Chromosomenzahlen in jeweils 30 Zellen pro Zelllinie (A) und mittlere Chromosomenzahl je Zelllinie im Gruppenvergleich (mittlere Chromosomenzahl aller HPV-negativer vs. aller HPV-positiver Zelllinien) (B)

Wie in Abbildung 6 erkennbar, zeigten unabhängig vom HPV-Status beide Gruppen von HNSCC Zelllinien komplex verteilte Chromosomenzahlen mit Modalzahlen von 49 bis 80 Chromosomen (hyperdiploid bis hypertriploid) in HPV-negativen und 54 bis 72 Chromosomen (hyperdiploid bis triploid) in HPV-positiven Linien. Dabei unterschied sich die mittlere Anzahl an Chromosomen in jeder Zelllinie, wobei die Chromosomenzahlen in HPV-negativen eine höhere Varianz aufwiesen als in HPV-positiven Linien. Die Einzelwerte aller Zelllinien streuten von 47 bis 85 Chromosomen pro Metaphase (Abb. 6A). Im Mittel zeigte sich im Vergleich der Gruppe der HPV-negativen Zelllinien mit der Gruppe der HPV-positiven Zelllinien (Gruppenvergleich) kein signifikanter Unterschied zwischen HPV-negativen und HPV-positiven Zelllinien mit durchschnittlich 68 bzw. 66 Chromosomen pro Zelle ($P = 0,325$; Abb. 6B).

Der Aneuploidiegrad lässt sich durch die chromosomale Ploidie angeben, die sich durch die durchschnittliche Chromosomenzahl der jeweiligen Tumorzelllinie im Verhältnis zum Chromosomensatz diploider Zellen berechnen lässt.

$$\text{Chromosomale Ploidie} = \frac{\text{Chromosomen Tumorzelle}}{\text{Chromosomen diploide Zelle (46)}}$$

Die HPV-negativen Zelllinien wiesen dabei durchschnittlich einen 1,48-fachen Chromosomensatz, die HPV-positiven einen 1,45-fachen Chromosomensatz auf. Die Einzelwerte für die Zelllinien sind in unten stehender Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Chromosomale Ploidie pro Zelllinie nach Chromosomenzahlbestimmung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 30 Metaphasen und deren Standardabweichung

HPV-negative Zelllinien

Zelllinie	UD-SCC1	UM-SCC-3	UM-SCC-6	UM-SCC-11B	UT-SCC-33
Ploidie	1,64 ± 0,09	1,61 ± 0,09	1,36 ± 0,07	1,08 ± 0,06	1,74 ± 0,08

HPV-positive Zelllinien

Zelllinie	UD-SCC1	UM-SCC-3	UM-SCC-6	UM-SCC-11B	UT-SCC-33
Ploidie	1,18 ± 0,03	1,57 ± 0,09	1,45 ± 0,06	1,54 ± 0,06	1,42 ± 0,05

3.3 Durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehalts

Eine Erhöhung der Chromosomenzahl führt in der Regel zu einer proportionalen Erhöhung des DNA-Gehalts, der sich durchflusszytometrisch bestimmen lässt. Für die 10 Zelllinien ist das Ergebnis der in 2.6 beschriebenen Analyse von jeweils 20.000 Zellen pro Zelllinie in unten stehender Abbildung 7 dargestellt.

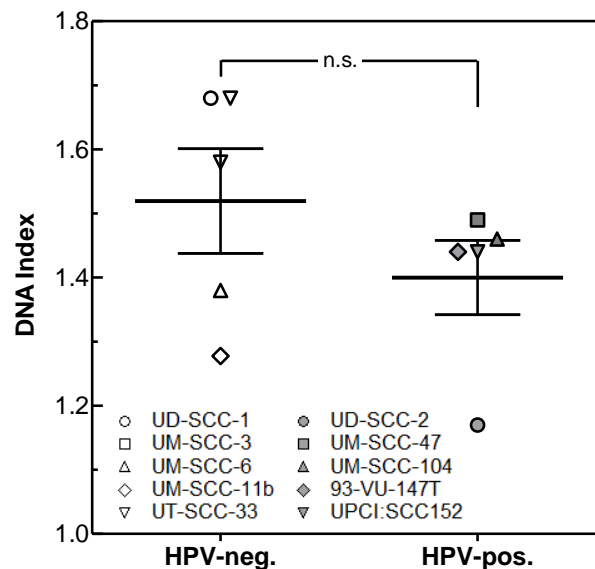


Abbildung 7: Verteilung der DNA-Indices in HPV-positiven (helle Symbole) und HPV-negativen Zelllinien (dunkle Symbole) und Mittelwerte

Bildet man den Mittelwert der DNA-Indices der beiden Gruppen, ergibt sich für die HPV-negativen Zelllinien ein durchschnittlicher DNA-Index von 1,51 und für die HPV-positiven ein DNA-Index von 1,40. In Bezug auf den DNA-Index wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien gefunden ($P = 0,267$).

Um zu prüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem durchflusszytometrisch bestimmten DNA-Index und den in GTG-gefärbten Metaphase-Präparaten ermittelten Chromosomenzahlen gibt, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt, die in Abbildung 8 dargestellt ist.

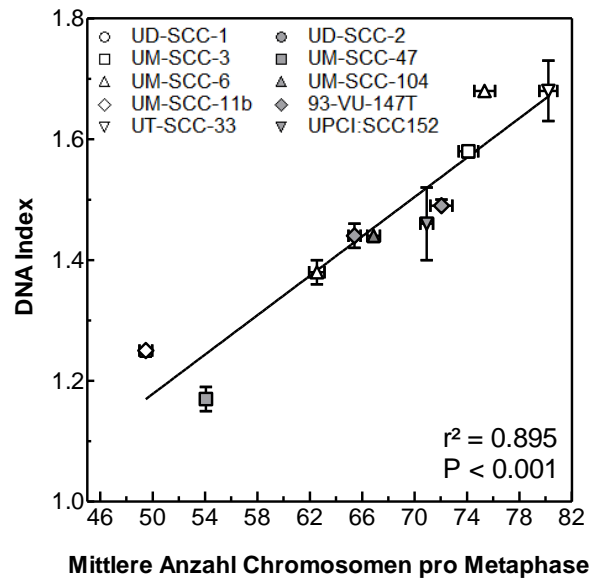


Abbildung 8: Korrelation der Werte der Chromosomenzählung mit den durchflusszytometrisch ermittelten DNA-Indices. r^2 = Korrelationskoeffizient; P = Signifikanzniveau

Die Korrelation der mittleren Anzahl von Chromosomen per Metaphase mit dem jeweiligen DNA-Index zeigt, dass der DNA-Index im Sinne einer generellen Aneuploidie mit der Anzahl der Chromosomen ansteigt und wie zu erwarten gut korrelieren.

Tabelle 3: Ergebnis der DNA-zytometrischen Bestimmung des DNA-Index pro Zelllinie. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis drei unabhängigen biologischen Experimenten und deren Standardabweichung.

HPV-negative Zelllinien

Zelllinie	UD-SCC1	UM-SCC-3	UM-SCC-6	UM-SCC-11B	UT-SCC-33
DNA-Index	1,68 ± 0,01	1,58 ± 0,01	1,38 ± 0,02	1,25 ± 0,01	1,68 ± 0,05

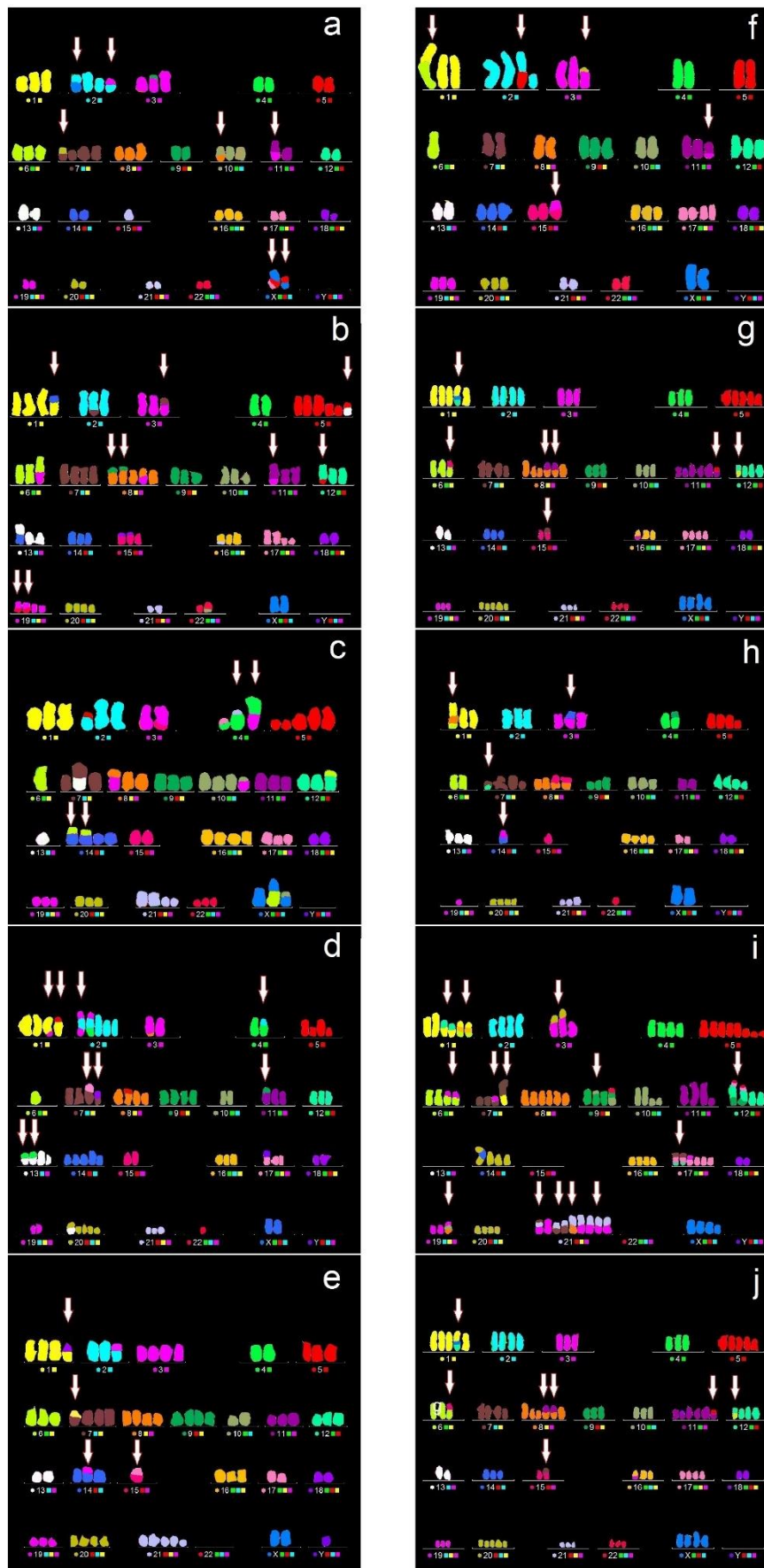
HPV-positive Zelllinien

Zelllinie	UD-SCC2	UM-SCC-47	93-VU-147T	UM-SCC-104	UPCI:SCC-152
DNA-Index	1,17 ± 0,02	1,49 ± 0,01	1,44 ± 0,01	1,46 ± 0,06	1,44 ± 0,02

3.4 Multicolor-Fluoreszenz in situ Hybridisierung (m-FISH)

3.4.1 Numerische Aberrationen in der m-FISH Analyse

Durch die m-FISH Analyse sollte festgestellt werden, ob sich die beiden Gruppen der Kopf-Hals-Tumorzelllinien hinsichtlich numerischer oder struktureller Chromosomenaberrationen unterscheiden. Dafür wurden wie in Kapitel 2.4 beschrieben pro Zelllinie 15 m-FISH-Karyogramme anhand ihrer Farbsignatur angefertigt. Diese sind in Abbildung 9 für jede Linie exemplarisch dargestellt. Die Karyogramme zeigen neben ganzen Chromosomen und Chromosomensegmenten auch komplexe interchromosomale Umlagerungen. Die weißen Pfeile markieren dabei die Chromosomen, in denen mit einer Häufigkeit von mindestens 9 von 15 Karyogrammen jeweils die gleiche Translokation gefunden wurde.



Zunächst wurden die Karyogramme zur Auswertung der Ploidie für jedes spezifische Chromosom herangezogen. Dabei wurden alle einem Chromosom zugeordneten Chromosomen - ungeachtet der Größe oder Vollständigkeit - als vollzähliges Chromosom gewertet. Bei Translokationen wurde das betroffene Chromosom dem Chromosom zugeordnet, welches das Zentromer enthielt.

Für die Zelllinie UD-SCC-1 wurden beispielsweise in obiger Abbildung 9A drei Chromosomen 1, vier Chromosomen 2 und drei Chromosomen 3 gezählt.

Abbildung 10 zeigt die gemeinsame chromosomale Ploidie je Chromosom für jeweils HPV-positive und HPV-negative Linien.

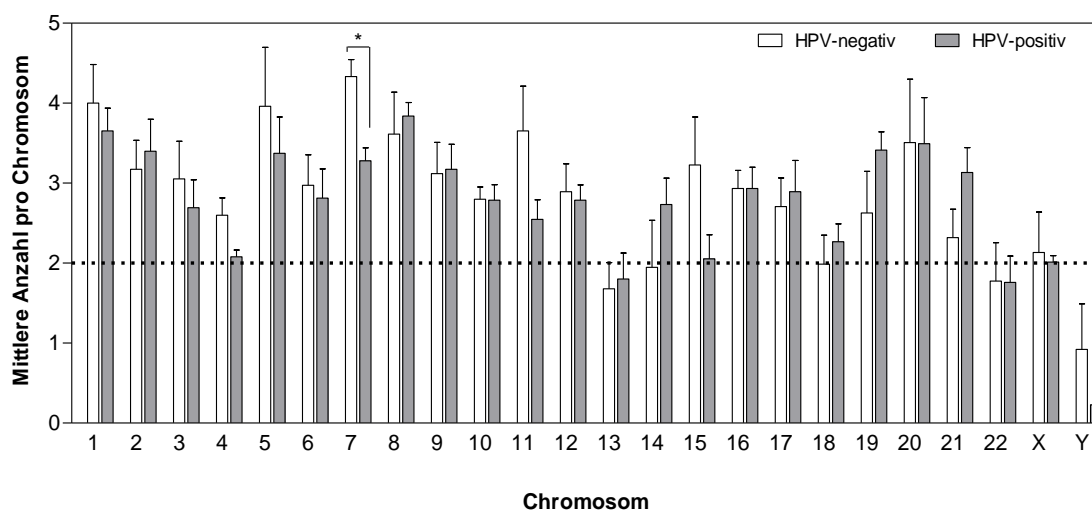


Abbildung 10: Mittels m-FISH analysierte chromosomale Ploidie in HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien

Erstaunlicherweise lagen in beiden Gruppen übereinstimmend die Chromosomen 4, 13, 14, 18, 22 und X nahezu diploid vor, die Chromosomen 2, 3, 6, 9, 10, 12, 16, 17 und 19 triploid und die Chromosomen 1, 5, 8 und 20 quatroploid vor. Bei den Chromosomen 7, 11, 15, 19 und 21 zeigte sich ein schwacher Unterschied zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien, der sich jedoch nur bei Chromosom 7 als signifikant erwies ($P = 0,006$).

Diese hohe Übereinstimmung wird in der Korrelationsanalyse deutlich, in der die Anzahl spezifischer Chromosomen in HPV-positiven Linien der der HPV-negativen Zelllinien gegenübergestellt wurde. Mit Ausnahme der Chromosomen 7, 11 und 15 (graue Symbole in Abb. 11) zeigte sich eine exzellente Korrelation zwischen den beiden Entitäten.

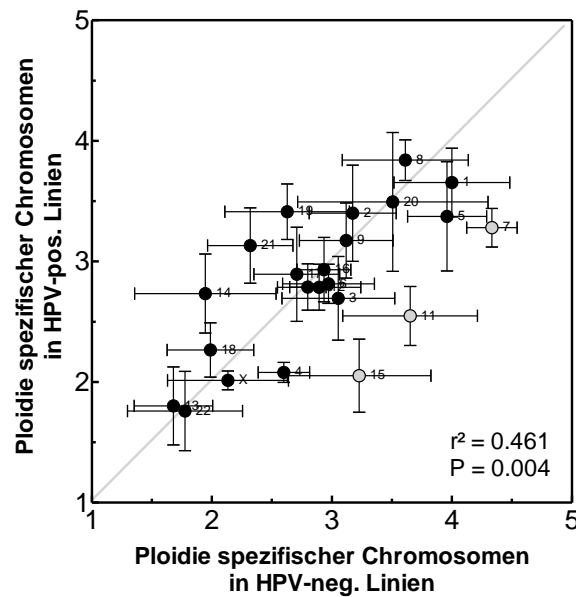


Abbildung 11: Nachweis einer statistisch signifikanten Korrelationen in der Analyse der Ploidie spezifischer Chromosomen in HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien (schwarze Symbole); abweichend davon liegen die Variablen der Chromosomen 7, 11 und 15 (graue Symbole)

Übereinstimmend mit dem Ergebnis der numerischen Analyse GTG-gefärbter Metaphase-Chromosomen konnte im direkten Vergleich m-FISH gefärbter Chromosomen im Mittel kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Abbildung 12 stellt die numerischen Ergebnisse der m-FISH-Analyse (Abb. 12A, $P = 0,777$) und der numerischen Chromosomenanalyse mittels GTG-Färbung (Abb. 12 B, $P = 0,709$) gegenüber. Die Ergebnisse beider Methoden zeigten eine geringere Varianz in der Anzahl der Chromosomen HPV-assoziiierter Linien im Vergleich mit HPV-negativen Zelllinien.

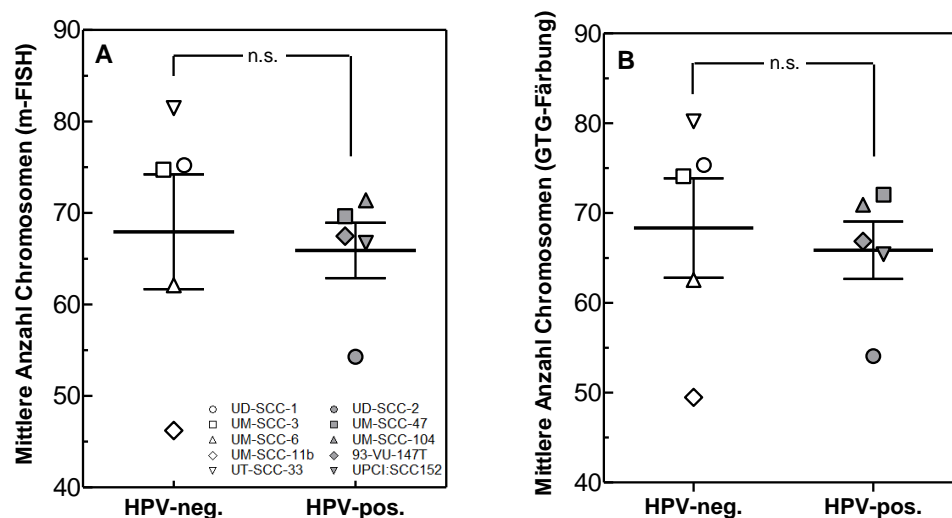


Abbildung 12: Mittlere Anzahl Chromosomen analysiert in m-FISH gefärbten (A) bzw. GTG-gefärbten Metaphase-Chromosomen (B) im Gruppenvergleich zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien.

3.4.2 Strukturelle Aberrationen in der m-FISH-Analyse

Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, wurde die Anzahl an Translokationsereignissen anhand von 15 m-FISH Metaphase Präparaten bestimmt. Die Daten für alle Zelllinien sind in Abbildung 13 für jede Zelllinien in einem Graustufen-Plot zusammengefasst, in dem über fünf Graustufenabstufungen Werte von ≥ 3 bis 0 Translokationen pro Metaphase dargestellt sind.

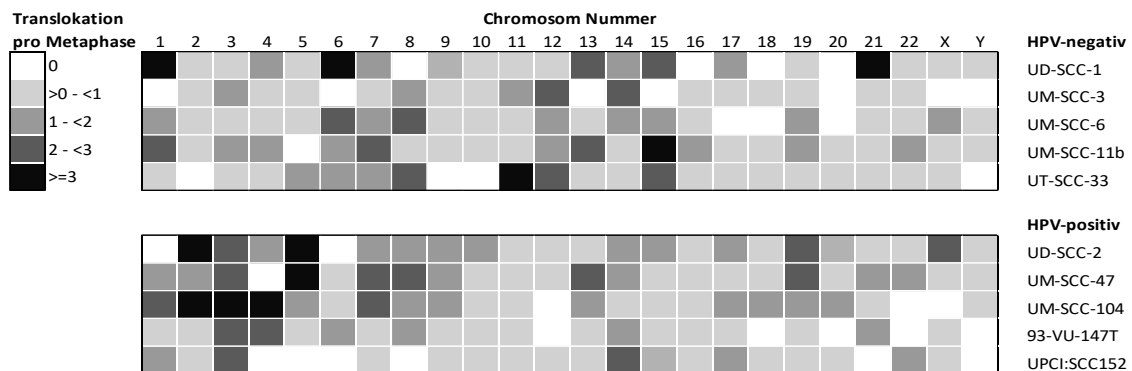


Abbildung 13: Häufigkeit von Translokationen in m-FISH-gefärbten Metaphase-Chromosomen, dargestellt für jedes Chromosom und jede Zelllinie.

In Abhängigkeit von der Zelllinie zeigte sich in HPV-negativen Linien (Abb. 13, oberes Diagramm) ein sehr heterogenes Bild, in dem jeweils unterschiedliche Chromosomen an Translokationen beteiligt sind. In den Chromosomen 6, 12 und 15 wurden Translokationen mit höherer Häufigkeit gefunden, wobei innerhalb der Gruppe der HPV-negativen Linien die Anzahl an Translokationen im Chromosom von Null bis sehr wenigen bis ≥ 2 erheblich variierte.

Für HPV-positive Zelllinien zeigte sich eine ähnliche Verteilung (Abb. 13, Diagramm unten). Im Vergleich zu HPV-negativen Zelllinien wurden jedoch weniger Chromosomen identifiziert, die in den jeweiligen Zelllinien Translokationen mit einer höheren Häufigkeit (≥ 2 pro Metaphase) aufweisen. Gehäufte Translokationsereignisse konnten in den Chromosomen 2, 3, 4 und 5 gefunden werden, wobei Chromosom 3 in allen fünf analysierten Zelllinien eine hohe bis sehr hohe (≥ 3) Anzahl an Translokationsereignissen aufwies. Im direkten Gruppenvergleich wies Chromosom 3 in HPV-positiven Zelllinien eine signifikant höhere Beteiligung an Translokationsereignissen auf als in HPV-negativen Zelllinien ($P = 0,014$). Die Translokationshäufigkeit zeigte im Gruppenvergleich für kein anderes Chromosom einen

derartigen Unterschied. Auch für die Chromosomen 12 und 18 konnten signifikante Unterschiede ($P = 0,035$ bzw. $P = 0,029$) berechnet werden, die sich jedoch auf die sehr niedrige Translokationshäufigkeit in den Virus-assoziierten Linien im Vergleich zu den HPV-negativen Zellen zurückführen lassen. Eine stabile, d.h. bei HPV-positiven oder HPV-negativen Zelllinien wiederkehrende Translokation konnte nicht gefunden werden.

Abbildung 14 fasst das Gesamtergebnis der Verteilung der Translokationen je Chromosom und Gruppe als *Circos Plot* zusammen (erstellt von Dr. Jochen Wilhelm, Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Gießen mit Daten von J. Patze). Die Bogenlänge der jeweiligen Chromosomen im Kreis ist dabei proportional zur Häufigkeit der Beteiligung an Translokationen des jeweiligen Chromosoms. Die Verbindungslinien markieren die an der Translokation beteiligten Chromosomen und die Strichstärke der Linien entspricht der Häufigkeit der jeweiligen Verbindung.

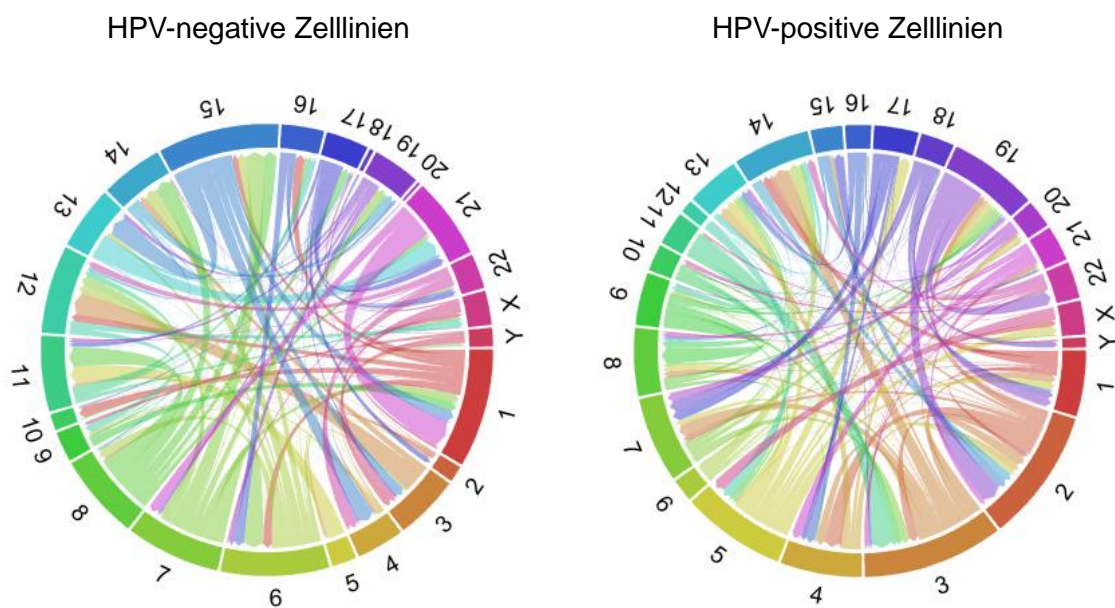


Abbildung 14: Gesamtergebnis der Translokationsanalyse in *m-FISH* gefärbten Metaphase-Chromosomen

Ein weiteres wichtiges Kriterium für chromosomale Instabilität stellt die Häufigkeit von Translokationen dar (Geigl et al., 2008). Die Zelllinien zeigten insgesamt eine breite Streuung in der Anzahl der Translokationen pro Metaphase von einem Minimum von 5,9 in der HPV-positiven UPCI:SCC152 bis zu einem Maximum von 16,33 in der HPV-negativen Zelllinie UD-SCC-1. Im Vergleich der mittleren Anzahl der Translokationen pro Metaphase ergab sich zwischen den beiden Gruppen jedoch kein signifikanter Unterschied. Bei HPV-negativen

Zelllinien wurden im Durchschnitt 11,3 Translokationen pro Karyogramm gefunden, bei

HPV-positiven Zelllinien im Mittel 11,4 (Abb. 15A, $P = 0,978$).

Weiterhin wurden die Zelllinien auf das Vorhandensein von komplexen Translokationen, d.h. Chromosomen, die aus mehr als zwei verschiedenen Chromosomen bestehen, untersucht. HPV-positive Zelllinien zeigten weniger komplexe Translokationen, der Unterschied war aber statistisch nicht signifikant. Abbildung 15 B zeigt das Ergebnis im direkten Vergleich beider Entitäten ($P = 0,443$).

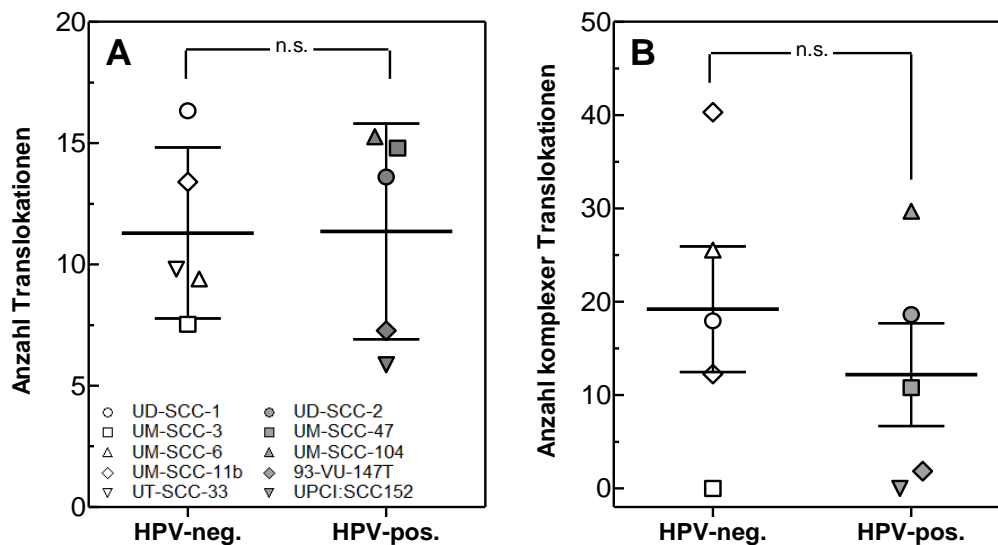


Abbildung 15: Mittlere Anzahl aller Translokationen (A) bzw. komplexer Translokationen (B) analysiert in m-FISH gefärbten Metaphase-Präparaten aus HPV-negativen und HPV-positiven Zelllinien

Wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben wurden die Zelllinien als weiteres Maß der chromosomalen Instabilität nach Empfehlung von Geigl und Koautoren (Geigl et al., 2008) auf die Variabilität von Zelle zu Zelle durch Analyse der klonalen und nicht-klonalen Aberrationen untersucht. Abbildung 16 A zeigt die Anzahl klonaler Translokationen pro Metaphase, Abbildung 16 B die Anzahl nicht-klonaler Translokationen pro Metaphase für die untersuchten HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC Zelllinien.

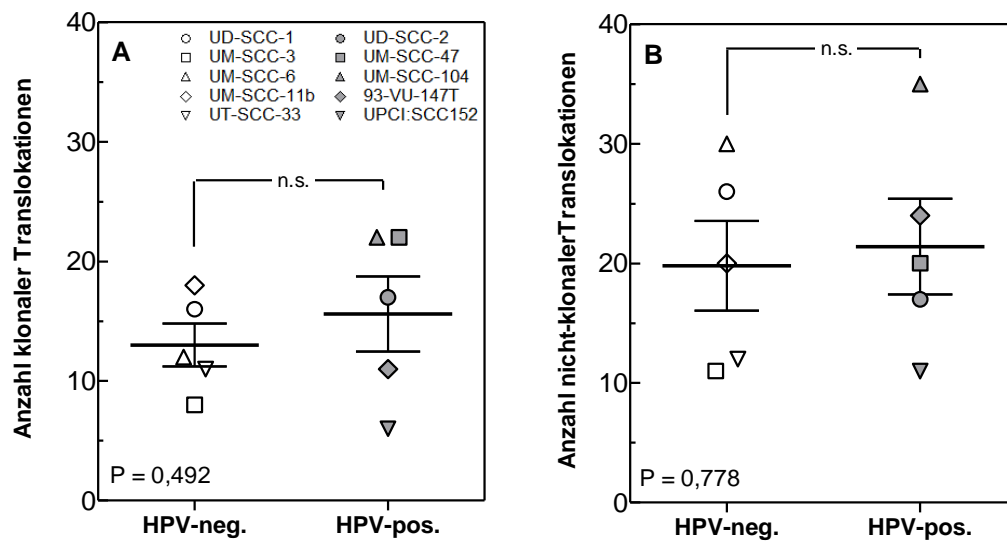


Abbildung 16: Durchschnittliche Anzahl klonaler Translokationen (links) und nicht-klonaler Translokationen (rechts) pro Metaphase für die Gruppe der HPV-negativen und der HPV-positiven Zelllinien

Es wurde ein kleiner, aber nicht signifikanter Unterschied mit durchschnittlich 13 klonalen Translokationen pro Zelllinie bei den HPV-negativen und 15,6 bei den HPV-positiven Zelllinien gefunden (Abb. 16 A). Bezogen auf die Gesamtzahl aller in der jeweiligen Gruppe gefundenen Translokationen entspricht dies einem Anteil von 85,25 % in HPV-negativen vs. 87,32 % in HPV-positiven Linien. Auch die durchschnittliche Anzahl nicht-klonaler Translokationen zeigte mit 19,8 vs. 21,4 Translokationen pro Zelllinie bzw. einem Anteil von 14,8 % vs. 12,7 % aller Translokationen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 16 B). Einige der klonalen Translokationen waren sogar mehr als einmal pro Metaphase vorhanden, was vermuten lässt, dass diese spezifischen Translokationen dann dupliziert wurden, als die Zelle aneuploid wurde.

Das in den beiden Entitäten gefundene Spektrum an Translokationen unterscheidet sich deutlich voneinander, was bei der weiteren Analyse der an der Translokationsbildung besonders häufig beteiligten Chromosomen ersichtlich wurde. Hierzu wurde in einem Streudiagramm die jeweilige prozentuale Beteiligung der Chromosomen an Translokationen in HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien gegeneinander aufgetragen, und nach Translokationen die in jeder analysierten Zelle oder mindestens jeder zweiten analysierten Zelle pro Zelllinie auftraten, weiter stratifiziert.

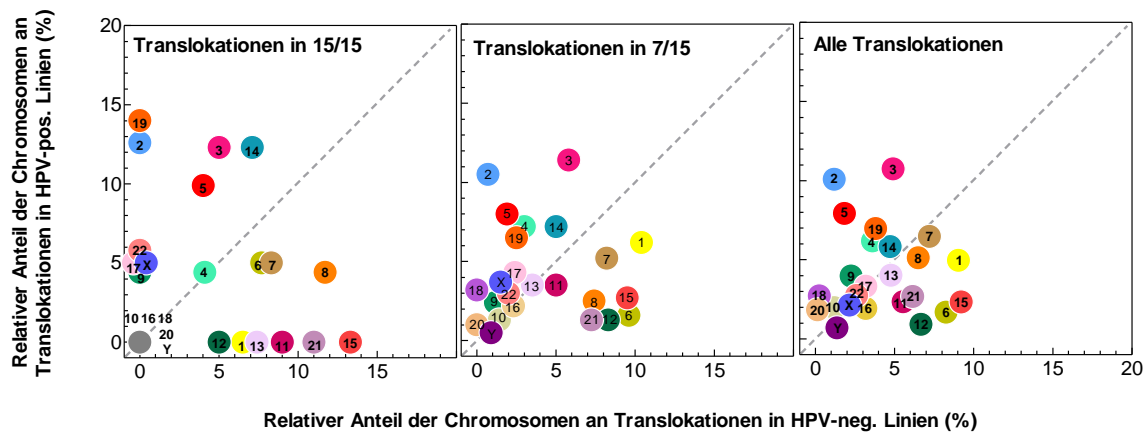


Abbildung 17: Prozentuale Beteiligung jedes spezifischen Chromosoms in jeder analysierten Metaphase (15/15, links), jeder zweiten analysierten Metaphase (7/15, Mitte) und der Gesamtheit aller (rechts) Translokationen in HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien.

Translokationen die in jeder der 15 analysierten Metaphasen pro Zelllinie gesehen wurden (Abb. 17, links) treten in HPV-positiven Linien in jeweils anderen Chromosomen auf, als in HPV-negativen Zelllinien. Nur wenige Chromosomen liegen bei dieser Betrachtung entlang der Diagonalen verteilt, haben also einen in beiden Entitäten gleich hohen relativen Anteil an der Bildung von Translokationen. Der Anteil an Chromosomen wird größer, wenn man die Betrachtung auf Translokationen ausweitet, die in mindestens jeder zweiten Zelle der jeweiligen Gruppe vorhanden sind (Abb. 17, Mitte). Selbst bei Betrachtung aller Translokationen ist ein deutlicher Unterschied im Spektrum der an Translokationen beteiligten Chromosomen zwischen der Gruppe der HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien vorhanden (Abb. 17, rechts).

In allen Analysen zeigt sich, dass in HPV-positiven Zelllinien die Chromosomen 2, 3 und 5 eine hohe Beteiligung an Translokationen haben, während in HPV-negativen Linien ein eher heterogenes Bild ohne eindeutige Präferenz ersichtlich ist, wobei die Chromosomen 6, 12 und 15 häufiger als andere Chromosomen an der Bildung von Translokationen beteiligt sind.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, chromosomale Instabilität vergleichend in HPV-positiven Zelllinien zu untersuchen und damit die Frage zu klären, ob die unterschiedliche Tumorbilogie von Noxen- und Viren-induzierten Kopf-Hals-Tumoren auch zu einem Unterschied in der genomischen Instabilität führt.

4.1 Zelllinien als Modell in der Tumorforschung

Weltweit existieren bis *dato* nur sieben Zelllinien, die aus HPV-induzierten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereichs stammen. Eine Etablierung von Zelllinien aus dieser Tumorentität erscheint aus bisher unbekannten Gründen schwieriger zu sein als bei anderen Tumorentitäten. Fünf dieser sieben erfolgreich etablierten Zelllinien, die eine hohe Bedeutung in der präklinischen Forschung besitzen, wurden in dieser Arbeit mit fünf HPV-negativen Zelllinien hinsichtlich ihrer genomischen Stabilität verglichen. Übereinstimmend mit klinischen Daten konnte in diesen Modellzelllinien bereits eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Strahlung (Arenz et al., 2014) und Cisplatin (Ziemann et al., 2015) gezeigt werden.

Experimente zur Validierung von Zelllinien durch Worsham und Kollegen (Worsham et al., 1999) zeigten, dass HNSCC Zelllinien die langfristig in Kultur gehalten wurden, die gleichen Aberrationen zeigten wie die ursprünglichen Tumorpräparate, aus denen sie etabliert wurden. Reshmi et al. (Reshmi et al., 2004) beobachteten zudem, dass die Karyotypen von HNSCC Zelllinien, besonders in Bezug auf klonale Aberrationen über längere Zeit stabil bleiben. Albertson et al. (Albertson et al., 2003) folgerten aus ihren Studien, dass klonale Aberrationen einen Selektionsvorteil darstellen und daher eher zu chromosomaler Stabilität führen. Auch die in dieser Arbeit beobachteten Aberrationen waren zum Großteil klonale Veränderungen.

Die Arbeitsgruppe von Henning Bier etablierte 1999 die HPV-negative Zelllinie UD-SCC-1 und die HPV-positive Zelllinie UD-SCC-2 (Balló et al., 1999). Dabei beschrieben die Autoren mit erstaunlicher Ähnlichkeit zu den hier gefundenen Ergebnissen die Linie UD-SCC-1 als hypertriploid und UD-SCC-2 als hypotriploid. Zudem wurden Aberrationen beschrieben, die teilweise auch in den hier untersuchten Zellen als klonale Translokationen zu finden waren. Dies entspricht den Thesen von Worsham (Worsham et al., 1999) und Reshmi (Reshmi et al., 2004). Die hier beschriebenen Zellen zeigten

jedoch deutlich mehr Translokation als jene, die 1999 von Ballo et al. (Balló et al., 1999) untersucht wurden. Dabei darf aber nicht außer Acht gelassen werden, dass damals lediglich eine G-Banden Färbung zur Identifikation von Aberrationen eingesetzt wurde. Dennoch scheinen sich die beiden Linien über die Jahre deutlich verändert zu haben.

Eine ähnliche Beobachtung machten Oda und Kollegen (Oda et al., 1996), die orale Epithelzellen mit HPV-16 DNA transfizierten und sie für vier Jahre mit insgesamt 350 Passagen kultivierten. Zwar erreichten diese Zellen nie Tumorigenität im Mausmodell, zeigten jedoch Immortalität und aggressives Wachstum *in vitro*. Während der Kultur wurde wiederholt der Karyotyp analysiert und dabei festgestellt, dass die Anzahl an Chromosomenaberrationen und die Aneuploidie mit der Dauer der Kultur zunahm. Die Autoren machten die viralen Proteine E6 und E7 hierfür verantwortlich und folgerten, dass diese entscheidend für eine progressive chromosomale Instabilität verantwortlich sind. Ihre Beobachtungen von 1996 wurden durch Arbeiten von Duensing (Duensing and Münger, 2002) und Marullo (Marullo et al., 2015) mit pathophysiologischen Korrelaten untermauert (siehe Kapitel 4.6).

4.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Untersuchung chromosomaler Instabilität: Möglichkeiten und Grenzen

Die 1996 von Speicher et al. (Speicher et al., 1996) entwickelte Methode des multicolour-FISH erlaubt die Visualisierung von 24 Chromosomen durch kombinatorische Markierung von Sonden mit nur fünf Farbstoffen in einem Hybridisierungsschritt. Wie bei allen Methoden, die ganze Chromosomen anfärben, ist die Aussagekraft hinsichtlich intrachromosomaler Veränderungen wie Deletionen, Duplikationen oder Inversionen begrenzt (Uhrig et al., 1999). Neben Translokationen wurden in der Auswertung der Metaphase-Präparate zwar auch weitere Arten von Aberrationen erkannt, diese waren aber methodisch bedingt nicht sicher auszuwerten und wurden daher ignoriert.

Die farblich klar abgrenzbaren Translokationen sind lichtmikroskopisch jedoch eindeutig zu bestimmen. Die größte Einschränkung liegt hier im Auflösungsvermögen der m-FISH für Translokationen. Dieses wird in der Fachliteratur mit etwa einer Megabase (= 1 Million Basenpaare) angegeben (Jalal and Law, 1999). Liegt die Größe des translozierten Segments unterhalb der Auflösungsgrenze, kann dieses nicht detektiert werden. Auch sehr kleine oder extrem kondensierte Chromosomen können die Interpretation der Fluorochrome erschweren. Zudem kann eine mangelhafte Qualität der

Chromosomenpräparation Schwierigkeiten in der Auswertung zur Folge haben, indem beispielsweise überschüssiges Cytoplasma auf dem Objektträger eine schlechtere Hybridisierung der Sonden bewirkt. Weiterhin kann eine zu starke Denaturierung des Probenmaterials ungleichmäßig kondensiertes Chromatin zur Folge haben, was wiederum in einer verminderten Signalintensität und einer Überstrahlungstendenz der angrenzenden Fluorochrome resultiert (Lee et al., 2001). In dieser Arbeit wurde durch Anfertigung mehrerer Objektträger pro Zelllinie die Auswahl geeigneter, fehlerfreier Proben ermöglicht.

Das Zentromer enthält repetitive Sequenzen, die bei verschiedenen Chromosomen vorkommen. Dieses imponiert im m-FISH häufig mit ungewöhnlichen Farben, da sie unübliche Farbkombinationen zeigen und keine eindeutige Zuordnung zulassen. Kleine Translokationen, die unmittelbar an ein solches Zentromer grenzen, können von diesem überstrahlt sein und die Detektion unmöglich machen (Castleman et al., 2000).

Ein weiteres Problem stellen die bei Tumorzellen nicht selten vorkommenden amplifizierten Genabschnitte dar, die als DNA-Segmente vervielfacht auf einem Chromosom vorliegen. Guan et al. konnten zeigen, dass diese Abschnitte bei Tumoren häufig aus Material von mindestens zwei verschiedenen Chromosomen bestehen (Guan et al., 1994). In m-FISH gefärbten Chromosomen würde hier eine Mischung der Fluorochrome auf sehr engem Raum resultieren, was zur Fehlinterpretation der Farbkombination oder zu nicht zuordenbaren Chromosomenabschnitt führen könnte (Lee et al., 2001).

4.3 Analyse zytogenetischer und DNA-zytometrischer Ploidie

Zellen werden als chromosomal instabil bezeichnet, wenn sie u.a. eine erhöhte Anzahl an Aberrationen aufweisen (Geigl et al., 2008). Dazu gehören neben einer erhöhten oder erniedrigten Chromosomenzahl, strukturelle Aberrationen, d.h. Veränderungen eines Chromosoms im Sinne von lichtmikroskopisch identifizierbaren Translokationen, Deletionen, Insertionen und Inversionen. Lichtmikroskopisch nicht sichtbare Veränderungen auf Basenebene wie Amplifikationen oder Punktmutationen werden nicht zu den Chromosomenaberrationen gezählt, können aber dennoch Ausdruck einer genomischen Instabilität sein. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Techniken eignen sich besonders zur Detektion von Veränderungen auf chromosomaler Ebene.

Sowohl in HPV-positiven als auch HPV-negativen Zelllinien wurde bei der numerischen Analyse der Metaphase-Chromosomen eine erhöhte Anzahl von Chromosomen mit

Mittelwerten von 65,7 und 68,1 Chromosomen gefunden (Abb. 6). HPV-positive Linien zeigten dabei eine vergleichsweise geringere Varianz innerhalb der Analyse der jeweiligen Linie. In einer Übersichtsarbeit beschreibt S.M. Gollin den „typischen“ Karyotyp von Kopf-Hals-Tumoren als nahezu triploid mit zahlreichen numerischen und strukturellen Veränderungen (Gollin, 2014). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte im Mittel ein nahezu triploider Chromosomensatz gefunden werden, wobei die HPV-negativen Zelllinien UT-SCC-33 mit 79,1 die höchste Anzahl Chromosomen bzw. die Linie UM-SCC-11b mit 49,5 die geringste Chromosomenzahl im Mittel aufwiesen. Im direkten Gruppenvergleich konnte zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Linien kein signifikanter Unterschied in der mittleren Chromosomenzahl festgestellt werden (Abb. 6 B).

Der aus diesem klassischen zytogenetischen Ansatz berechneten chromosomalen Ploidie wurde die DNA-zytometrisch bestimmten Ploidie gegenübergestellt (Abb. 7 und 8). Die Korrelation zeigt, dass der DNA-Gehalt im Sinne einer generellen Aneuploidie über eine Zunahme ganzer Chromosomen ansteigt. Chromosomale Aneuploidie führt zu messbaren Veränderungen des DNA-Gesamtgehalts, wobei aufgrund der unterschiedlichen Größe der individuellen Chromosomen diese naturgemäß auch einen unterschiedlichen Beitrag zum Gesamt-DNA-Gehalt leisten. Die Korrelation zeigt außerdem, dass DNA-Histogramme in der Lage sind, die Verhältnisse in sehr enger Wechselbeziehung zu den Verhältnissen auf chromosomaler Ebene wiederzugeben.

4.4 Analyse numerischer chromosomaler Aneuploidie

Bei der numerischen Chromosomen-Analyse wurden methodisch zwei verschiedene Ansätze angewendet: zum einen die Zuordnung der Chromosomen anhand einer klassischen Bänderungstechnik (GTG-gefärbte Chromosomen) und zum anderen die Zuordnung unter Verwendung unterschiedlich markierter DNA-Sonden in Kombination mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (m-FISH gefärbte Chromosomen). Die mit beiden Methoden erzielten Ergebnisse wurden in Abbildung 12 gegenübergestellt und zeigten eine hohe Übereinstimmung.

Die Ploidie wurde in m-FISH gefärbten Chromosomen nicht nach Vorliegen vollständiger Chromosomen beurteilt, sondern anhand der Anzahl zugeordneter, ganzer Chromosomen und Chromosomen mit segmentaler Aneusomie, also Chromosomen mit Zugewinnen oder Deletionen. In beiden Tumorentitäten lagen die meisten

Chromosomen entweder dreifach oder vierfach vor und nur sehr wenige diploid (Abb. 9). Im direkten Vergleich für HPV-positive und HPV-negative Kopf-Hals-Tumorlinien konnte eine große Ähnlichkeit in der Ploidie einzelner Chromosomen beobachtet werden. Das erhaltene Muster zeigte zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Linien eine hohe Übereinstimmung (Abb. 10). Diese statistisch signifikante Beziehung wurde in der Korrelationsanalyse der mittleren Anzahl je Chromosom in HPV-positiven und -negativen Linien verdeutlicht (Abb. 11). Abweichungen von diesem gemeinsamen Muster zeigten sich nur in den Chromosomen 7, 11 und 15, sowie statistisch signifikant für Chromosom 7.

Im Vergleich mit aktuellen Literaturdaten konnte in der Arbeit von Singchat et al. (Singchat et al., 2016) ein ähnliches Muster gefunden werden. In dieser Studie wurden zwei Zelllinienpaare, die jeweils aus dem primären Tumor im Pharynx bzw. Zungengrund und nach Metastasierung aus Lymphknoten im gleichen Patienten generiert wurden, u.a. mit m-FISH untersucht. Alle Zelllinien (HN3, HN12, HN30, HN31) weisen einheitlich einen Zugewinn in den Chromosomen 1, 7 und 11, also redundante numerische Aberration, auf. Die in dieser Publikation veröffentlichten m-FISH Daten wurde eigenen Daten gegenübergestellt und auch mit Daten einer aktuellen Publikation von Hess und Kollegen (Hess et al., 2017) verglichen, in der fünf HPV-negative Zelllinien (Cal27, UPCI:SCC040, UPCI:SCC099, UPCI:SCC131, UM-SCC1) in einer methodisch dem m-FISH Verfahren verwandten Karyotyp-Analyse (*spektrale Karyotypisierung*; SKY) untersucht wurden. Abbildung 18 stellt die eigenen Ergebnisse der Doktorarbeit den m-FISH Daten aus vier HNSCC Zelllinien (Singchat et al., 2016) und Ergebnissen der SKY-Analyse in fünf Kopf-Hals-Zelllinien (Hess et al., 2017) gegenüber. Die Aneuploidie lässt ein gleiches Muster für die Chromosom 1, 5, 7 und 20 vermuten, die in allen drei Analysen tetraploid vorliegen. Übereinstimmend wurden die Chromosomen 3, 6, 9, 10, 12 und 16 triploid oder nahezu triploid bzw. die Chromosomen 4 und 21 diploid bzw. nahezu diploid gefunden.

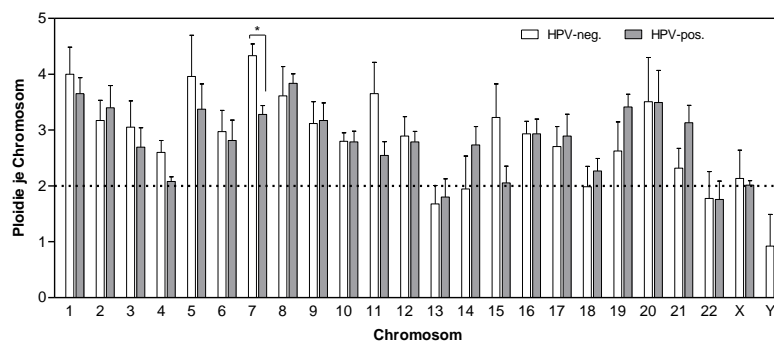
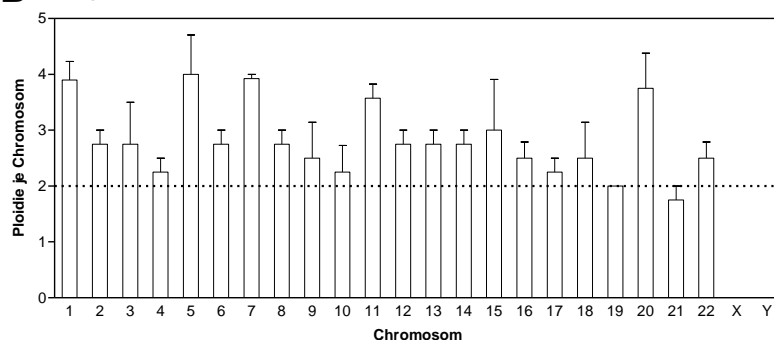
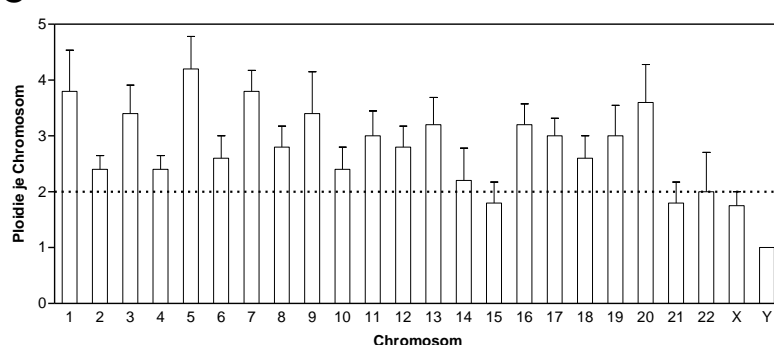
A *Eigene Daten***B** *Singchat et al. PLoS ONE 11(8): e0160901, 2016***C** *Hess et al. Cancer Letters 386: 87-99, 2017*

Abbildung 18: Mittlere Aneuploidie für jedes Chromosom in unterschiedlichen HNSCC Zelllinien, dargestellt als Mittelwerte mit Standardfehler SEM: A: Eigene Daten aus fünf HPV-negativen bzw. fünf HPV-positiven HNSCC Zelllinien; B: vier HPV-negative Zelllinien aus Singchat et al.; C: fünf HPV-negative Zelllinien aus Hess et al.

4.5 Analyse struktureller Aneuploidie

Neben einer quantitativen Analyse zur Bestimmung der Aneuploidie einzelner Chromosomen wurden die m-FISH-gefärbten Metaphase-Chromosomen auf strukturelle Aberrationen als Marker für chromosomale Instabilität untersucht. Hier wurde ein sehr heterogenes Muster für die Zelllinien der beiden Entitäten gefunden. Nahezu jedes

Chromosom zeigte sich an Translokationen beteiligt, wobei ein großer Unterschied in der Häufigkeit in Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie bestand. Keine der identifizierten Translokationen wurde in allen fünf HPV-Zelllinien nachgewiesen. Diese hohe Variation innerhalb der Translokationen wurde für Kopf-Hals-Zelllinien auch in anderen Arbeiten beschrieben (Heo et al., 1989; Jin et al., 1995; Sreekantaiah et al., 1994).

Im direkten Vergleich HPV-positiver und HPV-negativer Linien konnte hinsichtlich der Translokationshäufigkeit in keinem Chromosom ein signifikanter Unterschied gefunden werden, weder bei der Gesamtbetrachtung aller Translokationen, noch bei isolierter Betrachtung komplexer (Abb. 15 B) oder klonaler bzw. nicht-klonaler Translokationen (Abb. 16). Ein deutlicher Unterschied zeigte sich hingegen bei der Betrachtung der Translokationshäufigkeit für jedes Chromosom. Während bei HPV-positiven Linien in den Chromosomen 2, 3 und 5 bei den HPV-positiven Zelllinien die meisten Translokationen vorlagen, konnte in HPV-negativen Linien keine ähnlich eindeutige Präferenz gefunden werden. In der Gruppe der HPV-positiven Zelllinien war Chromosom 3 signifikant häufiger bei der Bildung von Translokationen beteiligt als in HPV-negativen Linien ($P = 0,014$). Eine besondere Rolle von Chromosom 3 für die chromosomale Instabilität von HPV-positiven Tumoren wurde von Dahlgren et al. in CGH-Analysen (*vergleichende genomische Hybridisierung*) beschrieben (Dahlgren et al., 2003).

Es ist bekannt, dass Chromosom 3 eine Vielzahl von Genen enthält, die an der Tumorprogression beteiligt sind. Insgesamt zeigten HPV-positive Tumore signifikant häufiger Zugewinne auf dem langen Arm (3q) und Verluste auf dem kürzeren Arm (3p) von Chromosom 3 im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren. Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 3 gilt als eine der häufigsten genomischen Veränderungen, die in HNSCC Tumoren beobachtet werden (Gollin, 2014; Heo et al., 1989). Weiterhin wurde das auf dem langen Arm von Chromosom 3 gelegene Onkogen PIK3CA in der Literatur bei HPV-positiven Tumoren als besonders häufig mutiert beschrieben (Seiwert et al., 2015; Lawrence et al., The Cancer Genome Atlas, 2015; Hayes et al., 2015). Nicols und Kollegen fanden in 28 % ihrer untersuchten HPV-positiven Tumore aktivierende Mutationen in PIK3CA und schlugen ein gezieltes Ausschalten dieses Onkogens im Rahmen einer *Targeted Therapy* vor (Nicols et al., 2013). Martin und Ko-Autoren (Martin et al., 2014) fanden in der Analyse von HNSCC Modellzelllinien eine Akkumulation von Veränderungen in PIK3CA und dem Gegenspieler von PI3K, der Phosphatase PTEN. Sie postulierten, dass in HPV-positiven Tumoren eine stabile Aktivierung des PI3K

Signalwegs in einem p53 und pRB inaktiven Hintergrund zur Tumorprogression ausreicht.

Chromosom 3 beinhaltet mit der Serin-Threonin-Proteinkinase ATR und FANCD2 weitere Schlüsselgene, deren Inaktivierung möglicherweise die höhere Strahlenempfindlichkeit in HPV-positiven Linien erklären könnte. Beide Gene spielen eine zentrale Rolle im Reparaturweg der homologen Rekombination, der in HPV-positiven Tumoren neueren Arbeiten zufolge defekt zu sein scheint (Bhide et al., 2016; Weaver et al., 2015; Ziemann et al., 2017).

Bei den HPV-positiven Zelllinien zeigte Chromosom 2 ebenfalls besonders viele Translokationen. Auch hier finden sich Gene wie BARD1, XLF, NHEJ1, ERCC3, XRCC5, MSH2 und MSH6, die in unterschiedlichen Reparaturwegen eine Rolle spielen und deren Bedeutung in weiterführenden Untersuchungen aufgeklärt werden sollten. Das auf Chromosom 2 codierte Gen von Caspase 8 wird als sowohl bei HPV-positiven als auch bei HPV-negativen Tumoren als signifikant häufiger mutiert beschrieben als andere Gene (Lawrence et al., The Cancer Genome Atlas, 2015). Zusätzlich wird es bei den HPV-positiven Tumoren durch E6 inhibiert und so der natürliche Zelltod gehemmt (Tungteakkhun et al., 2010).

4.6 Genomische Instabilität in Kopf-Hals-Tumorzelllinien

Der Term „Genomische Stabilität“ wird uneinheitlich verwendet. Geigl et al. (Geigl et al., 2008) zählten in ihrem Versuch einer Definition als Grundbestandteil neben chromosomaler Instabilität noch zwei andere Formen der Instabilität hinzu: die Mikrosatelliteninstabilität und den *CpG-Insel Methylator* Phänotyp. Beide wurden in dieser Analyse nicht berücksichtigt. Für eine umfassende Analyse der genomischen Instabilität im Sinne von Geigl et al. wären daher zusätzliche Methoden, wie eine komparative genomische Hybridisierung oder eine Genomsequenzierung nötig gewesen und sollten in einem Folgeprojekt weiter untersucht werden.

Nichtsdestotrotz stimmen die hier an Zelllinien erhobenen Daten mit den aus Tumorproben gewonnenen Daten in ihrer Aussage überein und belegen eine hohe Konkordanz in der genomischen Signatur der Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region unabhängig vom HPV-Status. Obwohl der Induktion von HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren eine unterschiedliche Kanzerogenese zugrunde liegt, entwickeln

beide Entitäten ein ähnliches Muster von numerischen Aberrationen, in das jedoch unterschiedliche strukturelle Chromosomenaberrationen involviert sind.

Chromosomale Instabilität (CIN) wird in Tumoren u.a. auf einen Defekt in der Chromosomensegregation zurückgeführt, der aus einer abnormalen Amplifikation von Zentrosomen resultiert (Vitre and Cleveland, 2012; Thompson et al., 2010) und in den Verlust als auch in die Inaktivierung über Mutationen von Wildtyp-p53 involviert sind. Agrawal und Kollegen fanden p53 in Noxen-induzierten Tumoren zu 78% mutiert vor, konnten in HPV-induzierten Tumoren jedoch keine Mutationen in p53 finden (Agrawal et al., 2011). Die Inaktivierung von p53 erfolgt in HPV-positiven Tumoren hingegen über das virale Onkoprotein E6 (Zhang et al., 2014). Da sowohl HPV-negative als auch HPV-positive HNSCC entweder durch mutiertes oder nahezu vollständig degradiertes p53 charakterisiert sind, sollte das Risiko einer Zentrosomenanomalie vergleichbar sein. Dieser Ansatz könnte die hohe Ähnlichkeit in der CIN erklären, die sowohl in der aktuellen Tumorforschung (Hayes et al., 2015; Lawrence et al., The Cancer Genome Atlas, 2015) als auch in der vorliegenden Arbeit in Tumorzelllinien für beide Entitäten beobachtet wird.

Dünsing und Münger konnten zeigen, dass die viralen Onkoproteine E6 und E7 bei der Induktion abnormaler Zentrosomenzahlen, aberranter mitotischer Spindelpolbildung und somit Herbeiführung genomischer Instabilität in Hochrisiko-HPV-Typen kooperieren (Duensing and Münger, 2002; Duensing et al., 2000). In Niedrigrisiko HPV-Typen, die keine Karzinome induzieren, konnte keine vergleichbare chromosomale Instabilität beobachtet werden (Fu et al., 1981).

E7 trägt direkt zu einer fehlerhaften Duplikation der Zentriolen bei, die teilweise zu einer multipolaren Mitose, d.h. eine Aufteilung des Erbmaterials in mehr als zwei Richtungen, führen kann, wodurch chromosomale Instabilität und Aneuploidie direkt gefördert werden. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Virus-DNA in das Wirtsgenom integriert ist oder episomal vorliegt. Auch wenn einige der Zellen, die eine multipolare Mitose durchführen, keine teilungsfähigen Tochterzellen hervorbringen, ist es wahrscheinlich, dass ein Teil der Zellen überlebt und so mitotische Defekte weitervererbt werden können.

Im Gegensatz dazu scheint die alleinige Expression von E6 zu Kernatypien und Mehrkernigkeit zu führen, was von Dünsing und Münger eindrucksvoll gezeigt wurde. Im experimentellen Ansatz zeigten diese Zellen keine Zellteilung mehr und gingen in eine

Seneszenz über (Duensing and Münger, 2002).

Marullo et al. (Marullo et al., 2015) zeigten zudem, dass HPV-positive Tumore einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sind. Dieser schien durch eine E6/E7-induzierte Aktivierung der NOX2-Oxidase (*Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat-Oxidase*) hervorgerufen zu werden. Durch die entstehenden freien Radikale werden Chromosomenschäden induziert und so chromosomale Instabilität gefördert. Da dieser Effekt nicht bei HPV-negativen Zellen beobachtet wurde, postulierten die Autoren virusinduzierten oxidativen Stress als Ursache chromosomaler Instabilität bei HPV-positiven Tumoren. Zudem konnten sie, vermutlich aufgrund einer geringeren antioxidativen Kapazität, eine höhere Empfindlichkeit gegenüber zusätzlichem oxidativem Stress im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren zeigen. Ihre Theorie wird dadurch unterstützt, dass HPV-positive Tumore und Zelllinien deutlich strahlensensibler sind (Kimple et al., 2013; Rieckmann et al., 2013; Arenz et al., 2014). Dies könnte u.a. durch eine erhöhte Sensibilität gegenüber reaktiver Sauerstoffspezies, wie sie bei einer Bestrahlung entstehen, erklärt werden (Blaisdell et al., 2001).

Sowohl Baksch et al. (Backsch et al., 2001) als auch Saxon et al. (Saxon et al., 1986) konnten an Zellen, die durch Hochrisiko-HPV (HPV Typen 16 und 18) immortalisiert wurden, zeigen, dass durch Einbringen eines ganzen Chromosoms, wie z.B. Chromosom 6, ein Wachstumsarrest und eine niedrigere Telomerase-Aktivität induziert werden kann. Dies legt nahe, dass der Verlust genetischen Materials, der im Rahmen chromosomaler Instabilität entsteht, einen zusätzlichen Wachstumsvorteil darstellen kann.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Hinsichtlich der Ploidie des gesamten Chromosomensatzes bzw. der Ploidie einzelner Chromosomen wurde in HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien ein sehr ähnliches Muster gefunden. Unterschiede zwischen den Entitäten zeigten sich hingegen bei strukturellen Chromosomenaberrationen und hier insbesondere für Chromosom 3. Die auf Chromosom 3 lokalisierten Reparaturgene ATR und FANCD2 sind Schlüsselgene im Doppelstrang-Reparaturweg der homologen Rekombination. Dieser Signalweg ist in HPV-positiven Tumoren defekt und könnte für die höhere Strahlenempfindlichkeit HPV-positiver Tumore verantwortlich sein. Aus diesem Grund sollten beide Gene auf Funktionalität in nachfolgenden Untersuchungen analysiert werden.

5 Literaturverzeichnis

- Agaimy A**, Weichert W. Grading von Tumoren der Kopf-Hals-Region. *Pathologe*. 2016;37(4):285–92. doi:10.1007/s00292-016-0173-9.
- Agrawal N**, Frederick MJ, Pickering CR, Bettgowda C, Chang K, Li RJ, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science*. 2011;333(6046):1154–7. doi:10.1126/science.1206923.
- Albers AE**, Grabow R, Qian X, Jumah MD, Hofmann VM, Krannich A, Pecher G. Efficacy and toxicity of docetaxel combination chemotherapy for advanced squamous cell cancer of the head and neck. *Mol Clin Oncol*. 2017;7(1):151–7. doi:10.3892/mco.2017.1281.
- Albertson DG**, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet*. 2003;34(4):369–76. doi:10.1038/ng1215.
- Ang KK**, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(1):24–35. doi:10.1056/NEJMoa0912217.
- Arenz A**, Ziemann F, Mayer C, Wittig A, Dreffke K, Preising S, et al. Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. *Strahlenther Onkol*. 2014;190(9):839–46. doi:10.1007/s00066-014-0605-5.
- Backsch C**, Wagenbach N, Nonn M, Leistritz S, Stanbridge E, Schneider A, Dürst M. Microcell-mediated transfer of chromosome 4 into HeLa cells suppresses telomerase activity. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001;31(2):196–8. doi:10.1002/gcc.1134.
- Balló H**, Koldovsky P, Hoffmann T, Balz V, Hildebrandt B, Gerharz CD, Bier H. Establishment and characterization of four cell lines derived from human head and neck squamous cell carcinomas for an autologous tumor-fibroblast in vitro model.

Anticancer Res. 1999;19(5B):3827–36.

Bhide SA, Thway K, Lee J, Wong K, Clarke P, Newbold KL, et al. Delayed DNA double-strand break repair following platin-based chemotherapy predicts treatment response in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2016;115(7):825–30. doi:10.1038/bjc.2016.266.

Blaisdell JO, Harrison L, Wallace SS. Base excision repair processing of radiation-induced clustered DNA lesions. *Radiat Prot Dosimetry*. 2001;97(1):25–31.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006;354(6):567–78. doi:10.1056/NEJMoa053422.

Braakhuis BJM, Snijders PJF, Keune W-JH, Meijer CJLM, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(13):998–1006.

Budach W, Bölke E, Kammers K, Gerber PA, Orth K, Gripp S, Matuschek C. Induction chemotherapy followed by concurrent radio-chemotherapy versus concurrent radio-chemotherapy alone as treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC): A meta-analysis of randomized trials. *Radiother Oncol*. 2016;118(2):238–43. doi:10.1016/j.radonc.2015.10.014.

Castleman KR, Eils R, Morrison L, Piper J, Saracoglu K, Schulze MA, Speicher MR. Classification accuracy in multiple color fluorescence imaging microscopy. *Cytometry*. 2000;41(2):139–47.

Chao KS, Majhail N, Huang CJ, Simpson JR, Perez CA, Haughey B, Spector G. Intensity-modulated radiation therapy reduces late salivary toxicity without compromising tumor control in patients with oropharyngeal carcinoma: A comparison with conventional techniques. *Radiother Oncol*. 2001;61(3):275–80.

Conway C, Chalkley R, High A, MacLennan K, Berri S, Chengot P, et al. Next-generation sequencing for simultaneous determination of human papillomavirus load, subtype, and associated genomic copy number changes in tumors. *J Mol*

Diagn. 2012;14(2):104–11. doi:10.1016/j.jmoldx.2011.10.003.

Dahlgren L, Mellin H, Wangsa D, Heselmeyer-Haddad K, Björnestål L, Lindholm J, et al. Comparative genomic hybridization analysis of tonsillar cancer reveals a different pattern of genomic imbalances in human papillomavirus-positive and -negative tumors. *Int J Cancer*. 2003;107(2):244–9. doi:10.1002/ijc.11371.

Das LC, Karrison TG, Witt ME, Muller C, Stenson K, Blair EA, et al. Comparison of outcomes of locoregionally advanced oropharyngeal and non-oropharyngeal squamous cell carcinoma over two decades. *Ann Oncol*. 2015;26(1):198–205. doi:10.1093/annonc/mdu511.

Dietz A, Wichmann G, Wiegand S. Should We De-escalate the Treatment for HPV-Positive Tumors? Recent Results *Cancer Res*. 2017;206:173–81. doi:10.1007/978-3-319-43580-0_13.

Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 5:F55-70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083.

Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(18):10002–7. doi:10.1073/pnas.170093297.

Duensing S, Münger K. Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: Modeling the origins of genomic instability. *Oncogene*. 2002;21(40):6241–8. doi:10.1038/sj.onc.1205709.

Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893–917. doi:10.1002/ijc.25516.

Friedman JM, Stavas MJ, Cmelak AJ. Clinical and scientific impact of human papillomavirus on head and neck cancer. *World J Clin Oncol*. 2014;5(4):781–91. doi:10.5306/wjco.v5.i4.781.

Fu YS, Reagan JW, Richart RM. Definition of precursors. *Gynecol Oncol.* 1981;12(2 Pt 2):S220-31.

Geigl JB, Obenauf AC, Schwarzbraun T, Speicher MR. Defining 'chromosomal instability'. *Trends Genet.* 2008;24(2):64–9. doi:10.1016/j.tig.2007.11.006.

Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(29):3235–42. doi:10.1200/JCO.2015.61.6995.

Glenny A-M, Furness S, Worthington HV, Conway DI, Oliver R, Clarkson JE, et al. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: Radiotherapy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010(12):CD006387. doi:10.1002/14651858.CD006387.pub2.

Gollin SM. Cytogenetic alterations and their molecular genetic correlates in head and neck squamous cell carcinoma: A next generation window to the biology of disease. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014;53(12):972–90. doi:10.1002/gcc.22214.

Grenman R, Carey TE, McClatchey KD, Wagner JG, Pekkola-Heino K, Schwartz D. In Vitro radiation resistance among cell lines established from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 1991;67(11):2471–7.

Guan XY, Meltzer PS, Dalton WS, Trent JM. Identification of cryptic sites of DNA sequence amplification in human breast cancer by chromosome microdissection. *Nat Genet.* 1994;8(2):155–61. doi:10.1038/ng1094-155.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hay RKM, Park J-G, Gazdar A. *Atlas of Human Tumor Cell Lines.* Burlington: Elsevier Science; 1994.

Hayes DN, van Waes C, Seiwert TY. Genetic Landscape of Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer and Comparison to Tobacco-Related Tumors. *J Clin Oncol.* 2015;33(29):3227–34. doi:10.1200/JCO.2015.62.1086.

- Heo DS**, Snyderman C, Gollin SM, Pan S, Walker E, Deka R, et al. Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res.* 1989;49(18):5167–75.
- Hess J**, Unger K, Orth M, Schötz U, Schüttrumpf L, Zangen V, et al. Genomic amplification of Fanconi anemia complementation group A (FancA) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Cellular mechanisms of radioresistance and clinical relevance. *Cancer Lett.* 2017;386:87–99. doi:10.1016/j.canlet.2016.11.014.
- Jalal SM**, Law ME. Utility of multicolor fluorescent in situ hybridization in clinical cytogenetics. *Genet Med.* 1999;1(5):181–6. doi:10.1097/00125817-199907000-00003.
- Jemal A**, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(2):71–96. doi:10.3322/CA.2007.0010.
- Jemal A**, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69–90. doi:10.3322/caac.20107.
- Jin Y**, Mertens F, Jin C, Akervall J, Wennerberg J, Gorunova L, et al. Nonrandom chromosome abnormalities in short-term cultured primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 1995;55(14):3204–10.
- Jou A**, Hess J. Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. *Oncol Res Treat.* 2017;40(6):328–32. doi:10.1159/000477127.
- Kim Y**, Cho KH, Moon SH, Lee CG, Keum KC, Lee S-W, et al. Comparison of the Clinical Outcomes of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Tonsil Receiving Postoperative Ipsilateral Versus Bilateral Neck Radiotherapy: A Propensity Score Matching Analysis (KROG 11-07). *Cancer Res Treat.* 2017;49(4):1097–105. doi:10.4143/crt.2016.425.
- Kimble RJ**, Smith MA, Blitzer GC, Torres AD, Martin JA, Yang RZ, et al. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res.* 2013;73(15):4791–800. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0587.

- Klussmann** JP, Mooren JJ, Lehnen M, Claessen SMH, Stenner M, Huebbers CU, et al. Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clin Cancer Res.* 2009;15(5):1779–86. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1463.
- Knecht** R, Bussmann L, Möckelmann N, Lörincz BB. Ist Radio(chemo)therapie wirklich der zukünftige Standard für die Behandlung von Oropharynxkarzinomen? *HNO.* 2016;64(4):221–6. doi:10.1007/s00106-016-0147-5.
- Kreimer** AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467–75. doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0551.
- Lansford** CD, Grenman R, Bier H, Somers KD, Kim SY, Whiteside TL, et al., editors. *Human Cell Culture: Cancer Cell Lines Part 2 // Head and Neck Cancers.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2002.
- Lassen** P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2009;27(12):1992–8. doi:10.1200/JCO.2008.20.2853.
- Lawrence** MS and **The Cancer Genome Atlas Network.** Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015;517(7536):576–82. doi:10.1038/nature14129.
- Lee** C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson DO, Blennow E, et al. Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am J Hum Genet.* 2001;68(4):1043–7. doi:10.1086/319503.
- Lenarz** T, Boenninghaus H-G. *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde: Mit 6 Tabellen ; [mit Fallquiz].* 14th ed. Berlin: Springer; 2012.
- Lin** CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, Ferris RL. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck.* 2007;29(2):163–88.

- Lohaus F**, Linge A, Tinhofer I, Budach V, Gkika E, Stuschke M, et al. HPV16 DNA status is a strong prognosticator of loco-regional control after postoperative radiochemotherapy of locally advanced oropharyngeal carcinoma: Results from a multicentre explorative study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Radiother Oncol.* 2014;113(3):317–23. doi:10.1016/j.radonc.2014.11.011.
- Martin D**, Abba MC, Molinolo AA, Vitale-Cross L, Wang Z, Zaida M, et al. The head and neck cancer cell oncogenome: A platform for the development of precision molecular therapies. *Oncotarget.* 2014;5(19):8906–23. doi:10.18632/oncotarget.2417.
- Martins RG**, Parvathaneni U, Bauman JE, Sharma AK, Raez LE, Papagikos MA, et al. Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: A randomized phase II trial. *J Clin Oncol.* 2013;31(11):1415–21. doi:10.1200/JCO.2012.46.3299.
- Marullo R**, Werner E, Zhang H, Chen GZ, Shin DM, Doetsch PW. HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells. *Carcinogenesis.* 2015;36(11):1397–406. doi:10.1093/carcin/bgv126.
- McGowan-Jordan J**, Schmid M, editors. *ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016)*. Reprint of: *Cytogenetic and Genome Research 2016*, Vol. 148, No. 1. 1st ed. Freiburg im Breisgau, s.l.: Karger S; 2016.
- Moody CA**, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(8):550–60. doi:10.1038/nrc2886.
- Näsman A**, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer.* 2009;125(2):362–6. doi:10.1002/ijc.24339.
- Nygård M**, Aagnes B, Bray F, Møller B, Mork J. Population-based evidence of increased survival in human papillomavirus-related head and neck cancer. *Eur J Cancer.* 2012;48(9):1341–6. doi:10.1016/j.ejca.2012.03.014.

- Oda D**, Bigler L, Mao EJ, Distèche CM. Chromosomal abnormalities in HPV-16-immortalized oral epithelial cells. *Carcinogenesis*. 1996;17(9):2003–8.
- Quon H**, Vapiwala N, Forastiere A, Kennedy EB, Adelstein DJ, Boykin H, et al. Radiation Therapy for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2017;JCO2017738633. doi:10.1200/JCO.2017.73.8633.
- Rautava J**, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol*. 2012;6 Suppl 1:S3-15. doi:10.1007/s12105-012-0367-2.
- Reshmi SC**, Saunders WS, Kudla DM, Ragin CR, Gollin SM. Chromosomal instability and marker chromosome evolution in oral squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;41(1):38–46. doi:10.1002/gcc.20064.
- Reuschenbach M**, Wagner S, Würdemann N, Sharma SJ, Prigge E-S, Sauer M, et al. Humane Papillomviren bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion: Relevanz für Prognose, Therapie und Prophylaxe. *HNO*. 2016;64(7):450–9. doi:10.1007/s00106-016-0123-0.
- Rhie A**, Park WS, Choi MK, Kim J-H, Ryu J, Ryu CH, et al. Genomic Copy Number Variations Characterize the Prognosis of Both P16-Positive and P16-Negative Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma After Curative Resection. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(50):e2187. doi:10.1097/MD.0000000000002187.
- Rieckmann T**, Tribius S, Grob TJ, Meyer F, Busch C-J, Petersen C, et al. HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol*. 2013;107(2):242–6. doi:10.1016/j.radonc.2013.03.013.
- Saxon PJ**, Srivatsan ES, Stanbridge EJ. Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls tumorigenic expression of HeLa cells. *EMBO J*. 1986;5(13):3461–6.
- Seiwert TY**, Zuo Z, Keck MK, Khattri A, Pedamallu CS, Stricker T, et al. Integrative and

comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2015;21(3):632–41. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3310.

Sethi S, Ali-Fehmi R, Franceschi S, Struijk L, van Doorn L-J, Quint W, et al. Characteristics and survival of head and neck cancer by HPV status: A cancer registry-based study. *Int J Cancer.* 2012;131(5):1179–86. doi:10.1002/ijc.26500.

Sher DJ, Adelstein DJ, Bajaj GK, Brizel DM, Cohen EEW, Halthore A, et al. Radiation therapy for oropharyngeal squamous cell carcinoma: Executive summary of an ASTRO Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *Pract Radiat Oncol.* 2017;7(4):246–53. doi:10.1016/j.prro.2017.02.002.

Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol.* 2014;50(5):387–403. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.01.016.

Singchat W, Hitakomate E, Rerkarmnuaychoke B, Suntronpong A, Fu B, Bodhisuwan W, et al. Genomic Alteration in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Cell Lines Inferred from Karyotyping, Molecular Cytogenetics, and Array Comparative Genomic Hybridization. *PLoS ONE.* 2016;11(8):e0160901. doi:10.1371/journal.pone.0160901.

Smeets SJ, Braakhuis BJM, Abbas S, Snijders PJF, Ylstra B, van de Wiel MA, et al. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene.* 2006;25(17):2558–64. doi:10.1038/sj.onc.1209275.

Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet.* 1996;12(4):368–75. doi:10.1038/ng0496-368.

Sreekantaiah C, Rao PH, Xu L, Sacks PG, Schantz SP, Chaganti RS. Consistent chromosomal losses in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer.* 1994;11(1):29–39.

Steenbergen R, Hermsen M. Integrated human papillomavirus type 16 and loss of

heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an oral carcinoma and its derivative cell line. *Cancer Res.* 1995;54:65–71.

Tang AL, Hauff SJ, Owen JH, Graham MP, Czerwinski MJ, Park JJ, Walline H. UM-SCC-104: a new human papillomavirus- 16-positive cancer stem cell-containing head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Head Neck.* 2012;34(10):1480–91.

Thibaudeau E, Fortin B, Coutlée F, Nguyen-Tan P, Weng X, Audet M-L, et al. HPV Prevalence and Prognostic Value in a Prospective Cohort of 255 Patients with Locally Advanced HNSCC: A Single-Centre Experience. *Int J Otolaryngol.* 2013;2013:437815. doi:10.1155/2013/437815.

Thompson SL, Bakhoum SF, Compton DA. Mechanisms of chromosomal instability. *Curr Biol.* 2010;20(6):R285-95. doi:10.1016/j.cub.2010.01.034.

Tinhofer I, Jöhrens K, Keilholz U, Kaufmann A, Lehmann A, Weichert W, et al. Contribution of human papilloma virus to the incidence of squamous cell carcinoma of the head and neck in a European population with high smoking prevalence. *Eur J Cancer.* 2015;51(4):514–21. doi:10.1016/j.ejca.2014.12.018.

Tungteakkhun SS, Filippova M, Fodor N, Duerksen-Hughes PJ. The full-length isoform of human papillomavirus 16 E6 and its splice variant E6* bind to different sites on the procaspase 8 death effector domain. *J Virol.* 2010;84(3):1453–63. doi:10.1128/JVI.01331-09.

Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, et al. Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet.* 1999;65(2):448–62. doi:10.1086/302508.

Urban D, Corry J, Rischin D. What is the best treatment for patients with human papillomavirus-positive and -negative oropharyngeal cancer? *Cancer.* 2014;120(10):1462–70. doi:10.1002/cncr.28595.

van Kempen PMW, Noorlag R, Braunius WW, Moelans CB, Rifi W, Savola S, et al. Clinical relevance of copy number profiling in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 2015;4(10):1525–35. doi:10.1002/cam4.499.

- Vitre BD, Cleveland DW.** Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy. *Curr Opin Cell Biol.* 2012;24(6):809–15. doi:10.1016/j.ceb.2012.10.006.
- Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L.** Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res.* 2003;9(11):4227–39.
- Wagner S, Würdemann N, Hübbers C, Reuschenbach M, Prigge E-S, Wichmann G, et al.** HPV-assoziierte Kopf-Hals-Karzinome: Mutationssignaturen und genomische Aberrationen. *HNO.* 2015;63(11):758–67. doi:10.1007/s00106-015-0074-x.
- Watson JV, Chambers SH, Smith PJ.** A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry.* 1987;8(1):1–8. doi:10.1002/cyto.990080101.
- Weaver AN, Cooper TS, Rodriguez M, Trummell HQ, Bonner JA, Rosenthal EL, Yang ES.** DNA double strand break repair defect and sensitivity to poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibition in human papillomavirus 16-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6(29):26995–7007. doi:10.18632/oncotarget.4863.
- White JS, Weissfeld JL, Ragin CCR, Rossie KM, Martin CL, Shuster M, et al.** The influence of clinical and demographic risk factors on the establishment of head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol.* 2007;43(7):701–12. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.09.001.
- Wittekindt C, Wagner S, Mayer CS, Klussmann JP.** Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2012;11:Doc09. doi:10.3205/cto000091.
- Wolff K-D, Follmann M, Nast A.** The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(48):829–35. doi:10.3238/arztebl.2012.0829.
- Worsham MJ, Wolman SR, Carey TE, Zarbo RJ, Benninger MS, van Dyke DL.** Chromosomal aberrations identified in culture of squamous carcinomas are confirmed by fluorescence in situ hybridisation. *MP, Mol Pathol.* 1999;52(1):42–6.

- Zhang** D-H, Chen J-Y, Hong C-Q, Yi D-Q, Wang F, Cui W. High-risk human papillomavirus infection associated with telomere elongation in patients with esophageal squamous cell carcinoma with poor prognosis. *Cancer*. 2014;120(17):2673–83. doi:10.1002/cncr.28797.
- Ziemann** F, Arenz A, Preising S, Wittekindt C, Klusmann JP, Engenhardt-Cabillic R, Wittig A. Increased sensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines to x-irradiation \pm Cisplatin due to decreased expression of E6 and E7 oncoproteins and enhanced apoptosis. *Am J Cancer Res*. 2015;5(3):1017–31.
- Ziemann** F, Seltzsaam S, Dreffke K, Preising S, Arenz A, Subtil FSB, et al. Roscovitine strongly enhances the effect of olaparib on radiosensitivity for HPV neg. but not for HPV pos. HNSCC cell lines. *Oncotarget* 2017. doi:10.18632/oncotarget.22005.

6 Zusammenfassung

Kopf-Hals-Tumore (HNSCC) können durch die klassischen Noxen Tabak und Alkohol aber auch durch eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus induziert werden. Die zweite Gruppe stellt eine eigene Tumorentität dar mit bevorzugter Lokalisation im Oropharynx. Während HNSCC-Tumore weltweit rückläufig sind, steigt die Zahl HPV-assoziiierter Tumore in Europa, Japan und den USA deutlich an. Diese Patienten sind in der Regel jünger und haben weniger Begleiterkrankungen, vor allem aber zeigen sie nach Radiochemotherapie eine deutlich bessere Prognose.

Daten des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) zeigen, dass diese beiden Tumorentitäten sich offensichtlich nicht bezüglich Mutationslast oder Veränderung der Kopienzahl von Chromosomen unterscheiden, wohl aber in der Genexpression.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmalig anhand von jeweils fünf Zelllinien zu überprüfen, inwieweit sich HPV-negative und -positive Zellen bezüglich DNA-Gehalt sowie numerischer und struktureller Chromosomenaberrationen unterscheiden. Der DNA-Gehalt wurde mittels Flusszytometrie und die numerischen und strukturellen Aberrationen mittels G-Banden-gefärbten Metaphase-Präparaten bzw. m-FISH geprüft. Für beide Entitäten wird sowohl im DNA-Gehalt als auch in der Zahl der Chromosomen eine große Variation gefunden, wobei diese beiden Parameter eng miteinander korrelieren. Im Mittel besteht allerdings sowohl bezüglich DNA-Gehalt als auch Zahl der Chromosomen kein signifikanter Unterschied zwischen HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zelllinien.

Die Aneuploidie, wie sie mittels m-FISH für jedes Chromosom bestimmt wurde, zeigte je nach Chromosom eine große Variation zwischen diploidem, triploidem und tetraploidem Status. Besonders erstaunlich ist, dass bis auf Chromosom 7 diese Variation für HPV-negative und HPV-positive Zelllinien nahezu identisch ist. Diese Variation stimmte zudem mit den beiden einzigen bisher veröffentlichten Datensätzen überein. Daher wird für diese Variation bei HNSCC-Zellen von einer Gesetzmäßigkeit auszugehen, die zudem unabhängig vom HPV-Status ist.

Der Nachweis der strukturellen Chromosomenaberration zeigte für HPV-negative Zelllinien insgesamt ein sehr heterogenes Bild, während für HPV-positive Linien eine besondere Präferenz für die Chromosomen 2, 3 und 5 beobachtet wird. Insbesondere für Chromosom 3 wurden für HPV-positive Zellen signifikant mehr Translokationen nachgewiesen als für HPV-negative Linien. Es wird vermutet, dass in der chromosomalen Instabilität dieser Region die Ursache für die höhere Radiochemieempfindlichkeit HPV-positiver Tumore begründet ist.

7 Summary

Tumors of the head and neck region (HNSCC) are either induced by noxa such as alcohol and tobacco or by a permanent infection with the human papillomavirus (HPV). The second group is considered as a separate entity with preference especially for the oropharynx. Overall incidence of HNSCC is declining, while the incidence of HPV-positive HNSCC appears to increase especially in Europe, Japan and USA. The respective patients are generally younger with less co-morbidities, but more importantly show a much better response to treatment, especially radiochemotherapy.

Data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) indicate that these two entities appear not to differ with respect to the amount of mutations or copy number variations but differ in gene expression.

The aim of the present project was to examine for the first time whether these two entities might differ in DNA content, or numerical and structural chromosomal aberrations. The study was performed with five cell lines of each entity and DNA content was determined by flow cytometry and numerical and structural aberrations using G-banded metaphase chromosomes as well as m-FISH.

For both entities there was an enormous variation in both DNA content and number of chromosomes with an excellent correlation between these two parameters. However, on average there was no significant difference between HPV-negative and -positive HNSCC cell lines, neither for DNA content nor for the number of chromosomes. The level of aneuploidy was also determined for each specific chromosome. For both entities, a substantial variation was seen ranging between diploid, triploid as well as tetraploid. Surprisingly, except for chromosome 7 an astonishing similarity was seen for HPV-negative and -positive cell lines. An almost identical pattern was reported for the only two other data sets known so far. This finding suggests that in HNSCC cells this variation is highly regulated and independent of HPV status.

For structural chromosomal aberrations for HPV-negative cell lines overall a very heterogeneous pattern was seen, in contrast to HPV-positive cell lines, where a special preference was detected for chromosome 2, 3 and 5. For chromosome 3 the number of translocations was significantly higher for HPV-positive when compared to HPV-negative cell lines. It is suggested that the elevated genomic instability detected for chromosome 3 might lead to the enhanced response of HPV-positive HNSCC found for radiochemotherapy.

8 Anhang

8.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

8.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Alphabetische Auflistung der Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung (Abkürzung)	Hersteller, Standort
Accutase®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Alkylphenylpolyethylenglykol (Triton® X-100)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad iniectionabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
DAPI-Stocklösung, 200ng/ml	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium, ohne Magnesium (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut, unvergällt	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut, vergällt	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Euparal, Euparal für Mikroskopie	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FBS superior)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fixogum	Marabuwerte GmbH & Co KG, Tamm
Ficoll-Paque™	GE Healthcare Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA
Gentamycin	GE Healthcare Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA
Glycerol, reinst	Acros Organics, Geel, Belgien

Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	GE Healthcare Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween® 20)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RNaseA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPML-1640 Medium ohne L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Stabiles Glutamin 200 mM	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland
Trypsin-EDTA 1x	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Wasserstoffperoxid 35 % (H_2O_2)	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
Vectashield, Mounting medium for fluorescence	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA

8.1.2 Materialien

Tabelle 5: Alphabetische Auflistung der Materialien

Bezeichnung	Spezifikationen	Hersteller, Standort
Deckgläser	15 mm x 15 mm	VWR International, Radnor, PA, USA
Einmalspritzen	20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Flaschenaufsatzfilter	Durapore 0,22 µm	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
M-FISH Sondenmix	24X Cyte Human Multi-color FISH Probe Kit	MetaSystems GmbH, Altlussheim
Objektträger, Geschnitten mit Mattrand	25 x 75 x 1mm	Menzel GmbH Braunschweig
Pasteurpipetten	Soda-Glas, 150 mm	LLG Labware GmbH, Meckenheim, Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhrchen	5 ml für Durchflusszytometrie	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Membranfilter 0,2 µm PTFE	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zellkulturgefäße	10 cm ² , 21cm ² ; 75 cm ²	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

8.1.3 Geräte

Tabelle 6: Alphabetische Auflistung der Geräte

Bezeichnung	Spezifikationen	Hersteller
CO2-Inkubator	INCO153med	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
CO2-Inkubator	HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Dispenser	isopenser	ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Deutschland
Durchlichtmikroskop	Axioskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Feinwaage	Summit SI-64	Denver Instrument Inc., Denver, CO, USA
Floureszenzmikroskop	Axioplan 2 Imaging	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Gefrierschrank -20 °C	MediLine LKPv 6520	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C	Herafreeze Typ HFU 586 Basic	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Heizblock	ThermoCell CHB-202	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China
Kleinbrutschrank	Heraeus B 15	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Kühl-Gefrier-Kombination	Comfort	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Kurzzeitmesser	TR118	Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland
Mikroliterpipetten	Reference® 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroliterpipetten	Research® plus 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge	Heraeus FRESCO 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Netzgerät	peqPOWER 250	Peqlab, VWR International, Radnor, PA, USA

Netzgerät	ENDURO™ 300 V	Labnet International Inc., Edison, NJ, USA
Pipettierhelfer	accu-jet® pro	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettierhelfer	PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal, Deutschland
Sterilbank	HERASAFE KS 12	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Universalzentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Vertikaler Standautoklav	V-65	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Vortex-Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Zählkammer	Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland

8.1.4 Software

Tabelle 7: Alphabetische Auflistung der Software

Software		Hersteller, Standort
FlowJo		FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, USA
GraphPad Prism 5.0		Graph Pad Software Inc. La Jolla, Ca, USA
Ikaros software		MetaSystems, Altussheim
ISIS software		MetaSystems, Altussheim
Microsoft Office 2007		Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die nachfolgenden Damen und Herren in Marburg, denen ich an dieser Stelle herzlich danke.

Vorklinischer Studienabschnitt:

Basler, Bauer, Bette, Braun, Brehm, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Feuser, Grundmann, Koolman, Lill, Löffler, Luers, Milani, Mueller, Neumüller, Oliver, Preisig-Müller, Röhm, Schütz, Seitz, Steiniger, Schratt, Suske, Weihe, Westermann

Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Al-Fakhri, Arenz, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bender, Bien, Bohlander, Burchert, Czubayko, Damanakis, Donner-Banzhoff, Engenhardt-Cabillic, Fendrich, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Geks, Görg, Gress, Grimm, Grosse, Grzeschik, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Josephs, Kann, Kill, Klose, Kohler, Köhler, Kolb-Niemanm, König, Lohoff, Maier, Maisch, Moll, Mossdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Plant, Renz, Rierra-Knorrenschild, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schofer, Seifert, Sekundo, Sommer, Vogelmeier, Wagner, Werner, Wittig, Wulf, Zemlin

8.3 Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Andrea Wittig für die offizielle Betreuung der Dissertation und die Möglichkeit der Promotion in der Strahlentherapie danken. Aber auch für die Hilfe beim Erstellen von Postern und deren Präsentation, sowie der Korrektur der Dissertation und der ständigen Förderung, die es mir ermöglichte auf einem nationalen Kongress meine Forschungsergebnisse zu präsentieren.

An nächster Stelle möchte ich Frau Dr. Andrea Arenz aus dem Labor der Klinik für Strahlentherapie danken, die mein Interesse an der Strahlenbiologie durch ihr Seminar geweckt und mir anschließend ermöglicht hat, in diesem spannenden Bereich zu promovieren. In den Jahren im Labor stand sie mir stets als erste Ansprechpartnerin zur Seite und förderte besonders meine wissenschaftliche Tätigkeit. Für diese außergewöhnlich gute Betreuung: Danke!

Danach möchte ich Frau Evelyn Kornmann danken, dass sie mir bei den Arbeiten im Labor für Humangenetik, v.a. beim Anfertigen der Präparate, tatkräftig unterstützte. Auch hier fand ich immer ein offenes Ohr und eine herzliche Zusammenarbeit.

Frau Dr. Barbara Fritz, Leiterin des Labors für Humangenetik, gilt weitergehend mein besonderer Dank, da sie mir den Zugang zu selbigem Labor und somit die Auswertung meiner Daten ermöglichte und mich darin unterstützte.

Herrn Prof. Dr. Ekkehard Dikomey Gastprofessor an der Klinik für Strahlentherapie in Marburg möchte ich besonders dafür danken, dass er meiner Arbeit immer wieder neue Impulse gegeben hat. Bei der Auswertung und kritischen Interpretation der Daten konnte ich zudem viel von ihm lernen.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. Jochen Wilhelm aus der Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Gießen für den Circos Plot für Poster und Dissertation bedanken.

Den Mitarbeitern der FACS Core Facility der Philipps-Universität Marburg danke ich für die Bereitstellung der Analysegeräte für die durchflusszytometrischen Messungen durch Frau Dr. Arenz.

Frau Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic danke ich, dass sie mir als Direktorin der Klinik für Strahlentherapie ermöglicht hat, in den Laboratorien meine experimentellen Arbeiten durchzuführen.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern und Doktoranden aus dem Labor für Strahlentherapie und Humangenetik danken, die mir während meiner Promotion den Laboralltag versüßt haben: Stefanie Preising, Dr. Kristin Dreffke, Steve Seltzam, Frank Ziemann, Christian Kramer und Carina Fabian. V.a. möchte ich Viola Balzer danken, die mit mir die Hochs und Tiefs einer Promotion im Labor, aber auch des Praktischen Jahres geteilt hat.

Abschließend bin ich meinen Eltern Susanne und Ulrich Patze zu großem Dank verpflichtet, die mir mein Medizinstudium erst ermöglicht haben sowie meiner Freundin Stella Papadileris für die Unterstützung zu Hause. Allen anderen, die mich während meiner Zeit in den Labors für Strahlentherapie und Humangenetik begleitet haben und die ich hier nicht persönlich erwähnt habe, danke ich ebenfalls für die spannende und lehrreiche Zeit.